

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Klinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Reincke

***In vitro* Evaluation RIG-I-aktivierender, bifunktioneller siRNAs zur Therapie der
Akuten Myeloischen Leukämie**

Dissertation zum
Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hanna Lausmann, geb. Meinel
aus München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. S. Rothenfuß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Albert

Priv. Doz. Dr. T. Herold

Mitbetreuung durch den promovierten
Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG:

22.10.2020

In Liebe und Dankbarkeit
meiner Familie und Marvin

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.2	RIG-I-like Rezeptoren (RLR)	2
1.3	RIG-I in der zellulären Entwicklung und in Tumorzellen	5
1.4	RIG-I als therapeutische Zielstruktur in der Tumorthherapie.....	6
1.5	RNA-Interferenz (RNAi)	7
1.6	Prinzip der bifunktionellen 5'-Triphosphat-siRNA	8
1.7	Akute Myeloische Leukämie (AML)	10
1.7.1	Pathogenese und molekulargenetische Veränderungen.....	10
1.7.2	Therapiestandards der AML	11
1.7.3	Neue molekulare Therapiestrategien.....	12
1.8	Prinzip der DNA-basierten Nanopartikel	13
1.9	Fragestellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Geräte und Materialien	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Reagenziensätze	17
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.4	Sequenzen von RNAs, DNA-Templates, RNA-Oligonukleotiden und qPCR-Primern	20
2.1.5	Zelllinien	23
2.1.6	Design der DNA-basierten Nanopartikel.....	23
2.1.7	Software	25
2.2	Zellbiologische Methoden	25
2.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	25
2.2.2	Kultivierung von Tumorzelllinien	26
2.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	26
2.2.4	Transfektion von Zellen.....	26
2.2.5	Immunstimulation von Zellen	27
2.2.6	CellTiter-Blue Cell Viability Assay.....	27

2.2.7	Retrovirale Transduktion.....	28
2.2.8	Arbeiten mit Nanopartikeln	29
2.2.9	Organellenfärbung	30
2.3	Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1	RNA-Isolation	31
2.3.2	cDNA-Synthese	31
2.3.3	Quantitative <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	32
2.3.4	<i>In vitro</i> Transkription (IVT)	33
2.3.5	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	35
2.4	Durchflusszytometrie	35
2.4.1	Transfektionskontrolle	35
2.4.2	Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) zum Nachweis von Zelltod	36
2.4.3	Mediane und Spezifische Fluoreszenzintensität	36
2.5	Konfokale Mikroskopie.....	37
2.6	Statistische Analysen.....	37
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	Effekte der Stimulation von RLR in AML-Zelllinien.....	38
3.1.1	5'-Triphosphat-RNA und poly(I:C) induzieren die Hochregulation von RLR	38
3.1.2	Prototypische Liganden von RLR induzieren Expression und Sekretion des Chemokins IP-10.....	39
3.1.3	Die Stimulation von RLR führt zu reduzierter Zellviabilität	41
3.2	Target-spezifische siRNAs reduzieren die Viabilität von AML-Zelllinien	44
3.2.1	BRD4.....	44
3.2.2	FLT3.....	46
3.2.3	AML1-ETO	48
3.2.4	PLK1	50
3.2.5	WT1.....	51
3.2.6	MCL1.....	53
3.2.7	CDX2.....	55
3.2.8	NPM1	57
3.3	Analyse der Kombination von RIG-I-Aktivierung und Target-spezifischem <i>Knock-down</i>.....	61

3.3.1	Kombination von RIG-I-Aktivierung und <i>Knock-down</i> weist additive Effekte bei der Reduktion der Viabilität auf	61
3.3.2	Bifunktionelle siRNAs: Effekte der Kombination von RIG-I-Aktivierung und <i>Knock-down</i> in einem Molekül auf AML-Zelllinien.....	66
3.4	DNA-basierte Nanopartikel als neue Strategie zum zielgerichteten Transport von siRNA	68
3.4.1	DNA-basierte Nanopartikel werden von HeLa-Zellen endosomal und unabhängig von Folat aufgenommen	68
3.4.2	An Nanopartikel gebundene siRNA wird nicht zytoplasmatisch freigesetzt	71
3.4.3	Extra-endosomale Aufnahme kann durch Abspaltung des Fluorochroms vorgetäuscht werden.....	72
3.4.4	Einzelsträngige DNA-Moleküle, aber nicht Desoxynukleotid-Triphosphate, werden gleichermaßen aufgenommen wie DNA-basierte Nanopartikel	75
4	DISKUSSION.....	77
4.1	Ergebnisübersicht	77
4.2	RLR als therapeutische Zielstruktur	78
4.2.1	RLR als Zielstrukturen einer Tumorummuntherapie	78
4.2.2	Aktivierung von RLR als Auslöser von Zelltod.....	80
4.2.3	RIG-I in der zellulären Entwicklung hämatopoetischen Zellen	81
4.3	Evaluation der Zielgene der verschiedenen siRNA-Moleküle	83
4.3.1	BRD4.....	84
4.3.2	FLT3.....	85
4.3.3	AML1-ETO	86
4.3.4	PLK1	87
4.3.5	WT1.....	87
4.3.6	MCL1.....	88
4.3.7	CDX2.....	89
4.3.8	NPM1	90
4.4	Bifunktionelle siRNA in der Tumorthherapie.....	91
4.5	Zelluläre Aufnahme von DNA-basierten Nanopartikeln.....	92
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	97
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	100

7	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME	114
8	DANKSAGUNG	118
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	119
9.1	Originalarbeiten	119
9.2	Abstracts und Poster.....	119
9.3	Vorträge	120
10	AFFIDAVIT	121

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Der menschliche Organismus ist fortlaufend einer Vielzahl an Bakterien, Viren und Parasiten ausgesetzt. Zur Abwehr dieser körperfremden Mikroorganismen und Moleküle gibt es einerseits die angeborene Immunantwort, welche rasch auf Strukturen reagiert, die in vielen pathogenen Organismen vorkommen [1]. Andererseits gibt es das adaptive Immunsystem, welches verzögert, dafür aber spezifisch auf die Antigene des jeweiligen Erregers reagiert und ein immunologisches Gedächtnis entwickelt [2]. Bis letzteres aktiv geworden ist, schützt das angeborene Immunsystem den menschlichen Organismus in der Frühphase einer Infektion. Das adaptive Immunsystem verfügt über eine Vielzahl an Rezeptoren, die durch somatische Rekombination in jedem Individuum während seiner Lebenszeit entstehen und kann damit ein großes Repertoire an Antigenen erkennen. Dagegen beruht das angeborene Immunsystem auf keimbahnkodierten, in der Evolution selektierten Rezeptoren, welche konservierte Strukturen auf pathogenen Organismen detektieren. Dies ermöglicht eine Reaktion des Immunsystems ohne vorherigen Kontakt mit dem Erreger. Das angeborene Immunsystem basiert hauptsächlich auf der Erkennung von *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) durch spezifische Rezeptoren. Bei PAMPs handelt es sich um hochkonservierte Struktur motive von Mikroben, die im gesunden menschlichen Organismus so nicht oder zumindest nicht am selben Ort wie das pathogene Korrelat existieren. PAMPs sind in der Regel essentiell für die Funktionsfähigkeit von pathogenen Mikroorganismen und können daher von Mikroben nicht ohne Selektionsnachteil verändert werden. Diese Strukturen beinhalten beispielsweise bakterielles Peptidoglycan, Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien, bakterielle unmethylierte CpG-DNA-Sequenzen, virale doppel- oder einzelsträngige Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) oder Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) [1]. Unterschiedliche intra- oder extrazellulären Rezeptoren erkennen spezifisch die von verschiedenen Mikroorganismen exprimierten PAMPs. Diese Rezeptoren werden unter dem Begriff *pattern-recognition receptors* (PRRs) zusammengefasst und können anhand von strukturellen Eigenschaften in mehrere Rezeptorfamilien eingeteilt werden. Zu ihnen gehören zum einen einige lösliche Rezeptoren, zum anderen die membrangebundenen *Toll-like* Rezeptoren (TLRs),

C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLRs) und Scavenger-Rezeptoren, aber auch die intrazellulären Rezeptoren *retinoic acid-inducible gene I* (RIG-I)-like Rezeptoren (RLRs) und *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren (NLRs). Die Erkennung von PAMPs durch diese Rezeptoren resultiert in der Aktivierung spezifischer intrazellulärer Signalkaskaden, die neben weiteren Genprogrammen zur Erregerabwehr zur Produktion von Zytokinen wie Typ-I-Interferon (Typ-I-IFN), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor (TNF) führen [3].

1.2 RIG-I-like Rezeptoren (RLR)

Durch die Erkennung viraler RNA und nachfolgender Eradikation des sich replizierenden Virusgenoms sind RLR von großer Bedeutung bei der Generierung einer antiviralen Antwort. Die Familie der RLR umfasst die drei zytoplasmatischen Rezeptoren RIG-I [4, 5], *melanoma differentiation antigen 5* (MDA5) [6, 7] und *laboratory of genetics and physiology-2* (LGP2) [8]. Erstmals wurde RIG-I bei der Differenzierung von Zellen der Promyelozytenleukämie mithilfe von All-trans-Retinsäure beschrieben [9, 10]. Alle drei Rezeptoren werden im Zytoplasma der meisten Zelltypen exprimiert [11]. RIG-I und MDA5 enthalten zwei N-terminale *caspase activation and recruitment domains* (CARDs), eine DExD/H Box ATPase/Helikase-Domäne und eine C-terminale *repressor domain* (RD), wobei LGP2 keine CARDs besitzt. Während die Helikase-Domäne und die RD die Erkennung der viralen RNA ermöglichen, sind die CARDs essentiell für die Initiierung der intrazellulären Signaltransduktion [4, 12].

Da RIG-I und MDA5 individuelle Unterschiede in der Affinität für verschiedene RNA-Strukturen aufweisen, differieren die optimalen Liganden dieser beiden Rezeptoren [13]. Während RIG-I wichtig für die Erkennung von RNA-Viren wie Paramyxovirus, Influenza-Virus und Japanische Enzephalitis-Virus ist, wird durch MDA5 eine Immunantwort auf Picornaviridae initiiert [13]. Entscheidend für die RNA-Erkennung durch RIG-I ist die minimale Länge von 18 bis 20 Basen, die Anwesenheit eines Triphosphats am 5'-Ende, sowie ein komplementärer RNA-Strang mit einer Basenpaarung über einen Abschnitt von mindestens zehn Nukleotiden in direkter Nachbarschaft zu dem freien 5'-Triphosphat-Ende [14, 15]. Zudem kann eine zytoplasmatische AT-reiche doppelsträngige DNA (dsDNA) erkannt werden, nachdem sie in der betroffenen Zelle von der endogenen RNA-Polymerase III in eine

doppelsträngige RNA (dsRNA) einschließlich 5'-Triphosphat-Ende transkribiert wurde [16].

Für die Aktivierung von MDA5 ist die Existenz einer langen dsRNA ausschlaggebend. Diese entsteht bei der Replikation vieler Viren, ist jedoch nicht in eukaryotischen Zellen vorhanden. Dieser Unterschied ermöglicht eukaryotischen Zellen lange dsRNA als ein Virus-assoziiertes Merkmal zu erkennen. Das synthetische Analogon langer dsRNA, Polyinosin-Polycytidin-Säure (poly(I:C)), stellt den prototypischen Liganden des Rezeptors MDA5 dar [13, 17]. LGP2, das dritte Mitglied der RLR-Familie, fehlen die CARDs, sodass dieses Molekül allein nicht die Initiierung einer Signaltransduktion bewirken kann. Als Aufgabe dieses Rezeptors wird eine regulatorische Funktion auf RIG-I und MDA5 angenommen, allerdings bleibt dieser Sachverhalt kontrovers diskutiert. So wird für LGP2 sowohl eine negative Regulierung der RLR beschrieben [8, 18], als auch eine positive [19, 20].

Die Erkennung viraler RNA durch RLR führt zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren, sodass die CARDs freigelegt werden und mit *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS) interagieren können, welches auch als *IFN- β -promoter stimulator 1* (IPS-1), *virus-induced signaling adapter* (VISA) oder *CARD-adaptor inducing IFN- β* (Cardif) bekannt ist [21-24] (siehe Abbildung 1.1). Das in der mitochondrialen Membran lokalisierte IPS-1, interagiert mit *TNF receptor associated factor* (TRAF3) 3, was zur Aktivierung der nachgeschalteten Kinasen *TANK-binding kinase 1* (TBK1) und *I κ B kinase- ϵ* (IKK ϵ) führt. Diese wiederum phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren *interferon regulatory factor 3* (IRF3) und IRF7 [25-27]. IRF3 und IRF7 translozieren in den Nukleus um dort die Transkription von Zytokinen wie IFN- β , einigen IFN- α -Subtypen, pro-IL-1 β und Chemokinen wie *interferon gamma-induced protein 10* (IP-10) zu initiieren [28-32]. Des Weiteren rekrutiert IPS-1 die Proteine *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD), *Fas-associated protein with death domain* (FADD), Caspase-8 und Caspase-10, was über die Aktivierung des IKK-Komplexes in der Aktivierung von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) und letztendlich in der Transkription von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α mündet [21, 33, 34].

Neben der unmittelbaren Stimulation des angeborenen Immunsystems beeinflusst die RLR-Signalkaskade auch das adaptive Immunsystem indem es ebenso die Aktivierung und Reifung von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC), insbesondere von dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC), initiiert und dadurch die Auslösung eine T-Zellantwort erleichtern kann [35]. Zudem führt die Ausschüttung von NF- κ B- und IRF3/7-abhängigen Chemokinen und Zytokinen zur Modulation des adaptiven Immunsystems.

Auch kann die Aktivierung von RIG-I den programmierten Zelltod induzieren und so Virus-infizierte Zellen eliminieren. Dieser Mechanismus beinhaltet sowohl die intrinsische und die extrinsische Apoptose als auch die Pyroptose, eine Form der programmierten Nekrose. So führt beispielsweise die Aktivierung von RLR in Melanomzellen zur Beteiligung der mitochondrialen Zelltod-Signalkaskade, bei der Cytochrom c aus Mitochondrien freigesetzt wird und es zu einer Aktivierung von Caspase-9 und *apoptotic protease activating factor* 1 (Apaf-1) kommt, welche maßgeblich die intrinsischen Apoptose lenken [36]. Auch kann die Aktivierung von RIG-I verschiedene Faktoren der extrinsischen Apoptose beeinflussen, wie Fas und *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) [37, 38]. Wie oben bereits erwähnt, ist ein weiterer durch RIG-I-ausgelöster Zelltod-Mechanismus in myeloiden Zellen, die Pyroptose. Hierbei handelt es sich um eine stark immunogene Form des programmierten Zelltodes, bei der es über Aktivierung des Inflammasoms zur Bildung von Poren in der Zellmembran und zur Ausschüttung von *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) kommt und so eine inflammatorische Antwort ausgelöst wird [39].

Im Kontext der Tumorthherapie können diese Mechanismen genutzt werden und dabei auf mehreren Ebenen wirken. Zum einen löst RIG-I Aktivierung in der Tumorzelle selbst Zelltod aus. Zum anderen kommt es über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I Interferonen zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Und außerdem werden Zellen des adaptiven Immunsystems involviert, indem die mit Zytokinen angereicherte Umgebung diese anlockt und über aktivierte antigenpräsentierende Zellen stimuliert. Die synergistischen Effekte dieser Mechanismen für

die Tumorthherapie konnten unter anderem bereits im Pankreaskarzinom [40] und im Mammakarzinom [38] gezeigt werden.

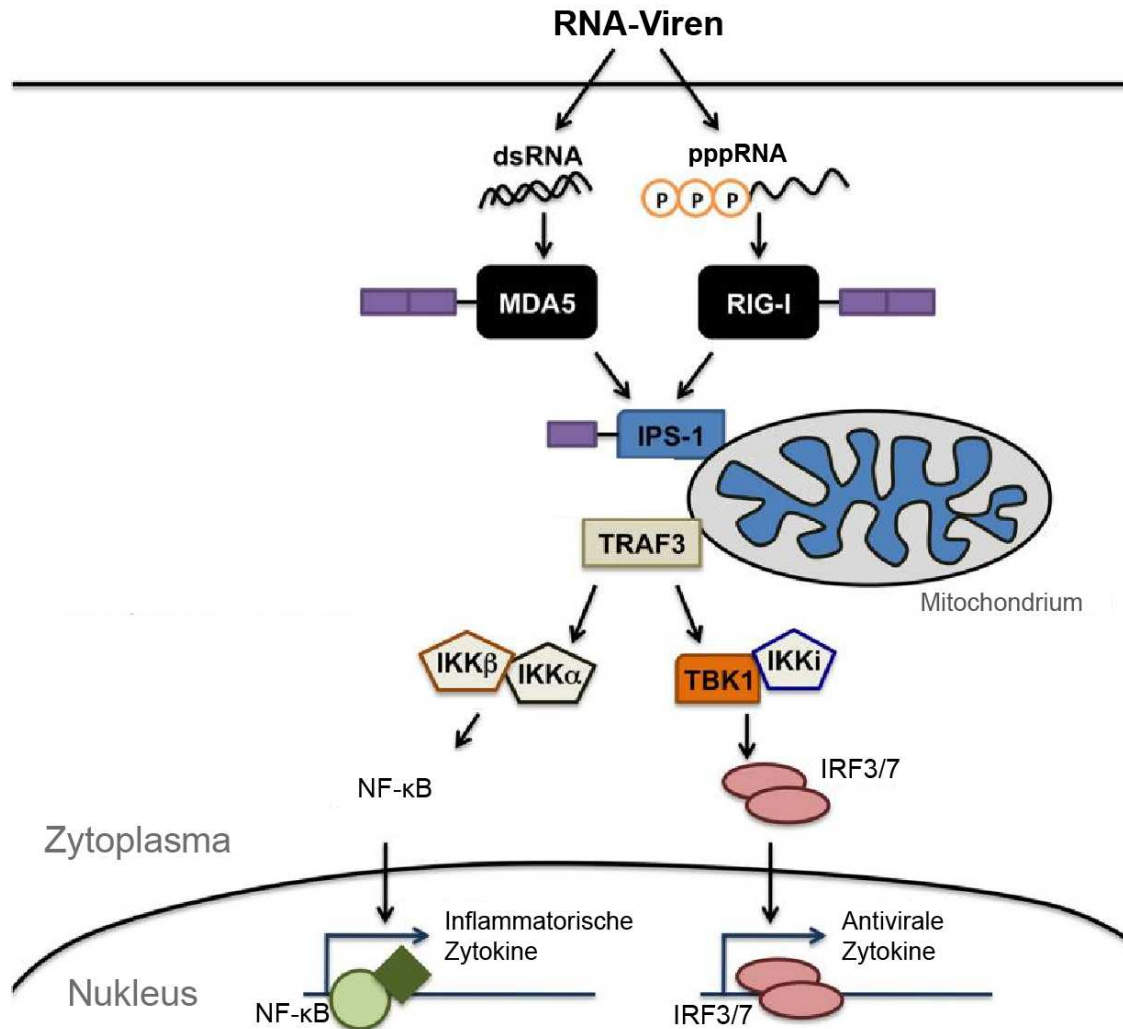


Abbildung 1.1 RIG-I-like Rezeptoren als zytoplasmatische Sensoren von viraler RNA. MDA5 erkennt dsRNA, während RIG-I kurze 5'-Triphosphat-RNA detektiert. Dies führt zur Rekrutierung von nachgeschalteten Effektormolekülen wie IPS-1 und TRAF3, die wiederum Kinasen der IKK-Familie und TBK1 induzieren. Die Kinasen aktivieren daraufhin NF-κB und IRF3/7, was zu dessen Translokation in den Nukleus und zur Transkription inflammatorischer und antiviraler Zytokine führt. Adaptiert von Furr und Marriott [41].

1.3 RIG-I in der zellulären Entwicklung und in Tumorzellen

Neben einer Rolle als PRR zur Erkennung viraler RNA wurden für RIG-I in den letzten Jahren diverse weitere biologische Funktionen zugeschrieben. So ist die Expression des Rezeptors in der Homöostase der späten Granulopoese von Bedeutung, indem er die Proliferation und das Überleben der Granulozyten negativ reguliert [42]. Über dies

ist eine weitere Funktion beschrieben, die in einem antileukämischen Effekt resultiert. Hierbei inhibiert RIG-I, auch ohne Stimulierung durch fremde RNA, den AKT-mTOR-Signalweg (Proteinkinase B, PKB oder AKT; *mechanistic target of rapamycin*, mTOR), sodass sowohl die Proliferation von myeloiden Vorläuferzellen als auch die *in vivo* Repopularisierungskapazität von AML-Zellen gehemmt ist [43]. Ergänzend konnten Jiang und Kollegen zeigen, dass Aktivierung von RIG-I die Proliferation bei AML-Zellen unter Verwendung des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) inhibiert [44]. Auch in diversen anderen Tumorentitäten ist RIG-I von Relevanz. So wird beispielsweise im hepatozellulären Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) durch RIG-I über die Expression von *interferon-stimulated genes* (ISGs) Karzinogenese und Tumorprogression begrenzt [45]. Diese Ergebnisse zeigen, dass RLR in vielen verschiedenen Tumorentitäten - hervorzuheben ist hierbei vor allem die Leukämie - spezifisch Apoptose auslöst und so die Tumorprogression verhindert.

1.4 RIG-I als therapeutische Zielstruktur in der Tumorthherapie

Die Möglichkeit über RIG-I Aktivierung einerseits den Zelltod zu induzieren und andererseits eine proinflammatorische Immunantwort des angeborenen und des adaptiven Immunsystems auszulösen, macht dieses Molekül zu einer interessanten Zielstruktur in der Tumorthherapie. In präklinischen Studien konnten in diversen Tumorentitäten bereits Erfolge erzielt werden, wie bei der Therapie des Melanoms [36], des hepatozellulären Karzinoms [45] oder der Leukämie [46]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen besonders anfällig sind für die oben beschriebene Induktion von Zelltod. So kann in Zellen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas mithilfe der Stimulation von RLR durch poly(I:C) Apoptose ausgelöst werden, während normale Epithelzellen des Pankreas nicht betroffen sind [47]. Ferner konnte in Melanomzellen gezeigt werden, dass die durch RIG-I induzierte Apoptose hauptsächlich in Tumorzellen stattfindet, da nicht maligne Zellen durch das anti-apoptotische Protein *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-x_L) geschützt sind [36]. Diese vielversprechenden Resultate haben kürzlich dazu geführt, dass ein RIG-I Stimulanz zur klinischen Evaluation in einer kombinierten Phase I/II Studie für fortgeschrittene solide Tumore (NCT03065023) untersucht wurde.

1.5 RNA-Interferenz (RNAi)

Während in Wirbeltieren virale RNA im Zytoplasma durch RLR erkannt werden (siehe 1.2), beruht die antivirale Immunität in Pflanzen und wirbellosen Tieren auf einem anderen RNA-basierten Mechanismus, bekannt als RNA-Interferenz (RNAi; siehe Abbildung 1.2). Hierbei wird virale dsRNA durch die Endoribonuclease Dicer in Fragmente gespalten, diese als *small interfering* RNA (siRNA) bezeichnete Fragmente sind 21 bis 23 Basenpaaren (bp) lang und besitzen einen 3'-Überhang von zwei Nukleotiden (nt) [48]. Sie binden nun an den *RNA-induced silencing complex* (RISC) [49] und führen letztendlich zur Erkennung und Zerstörung der viralen RNA [50]. Dieser Signalweg der RNAi ist in Säugetieren zwar konserviert, allerdings fungiert das Enzym Dicer hier physiologisch in der Prozessierung von microRNAs. Dabei handelt es sich um kurze, nicht translatierte RNA-Moleküle, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren [51]. MicroRNAs binden an den 3' untranslatierten Bereich (*untranslated region*, UTR) einer mRNA mit nicht völliger Komplementarität und bewirken so eine Repression der Translation [52].

Im experimentellen Setting kann man sich den konservierten Mechanismus der RNAi zu Nutze machen, sodass das siRNA-basiertes *Gen-Silencing* eine häufig verwendete Methode darstellt [53, 54]. Es wird posttranskriptionell in die Genregulation eingegriffen indem sequenzspezifisch *messenger* RNA (mRNA) abgebaut wird. Hierbei wird eine synthetische doppelsträngige siRNA mit 21 bp eingeführt, welches ebenfalls an den RISC Komplex bindet. In diesem Komplex wird die siRNA zunächst entwunden und der Leitstrang ausgewählt, während der Begleitstrang den Komplex verlässt und abgebaut wird [55, 56]. Hierbei spaltet das Argonautenprotein 2 (Ago2), eine katalytische Komponente von RISC, den Begleitstrang und setzt so den Leitstrang frei [57]. Anschließend wird eine zu diesem Strang komplementäre mRNA in RISC eingebaut und gespalten, sodass die mRNA abgebaut und damit die Translation verhindert wird [49, 58]. Diese Inhibition der Genexpression wird als *Knock-down* bezeichnet.

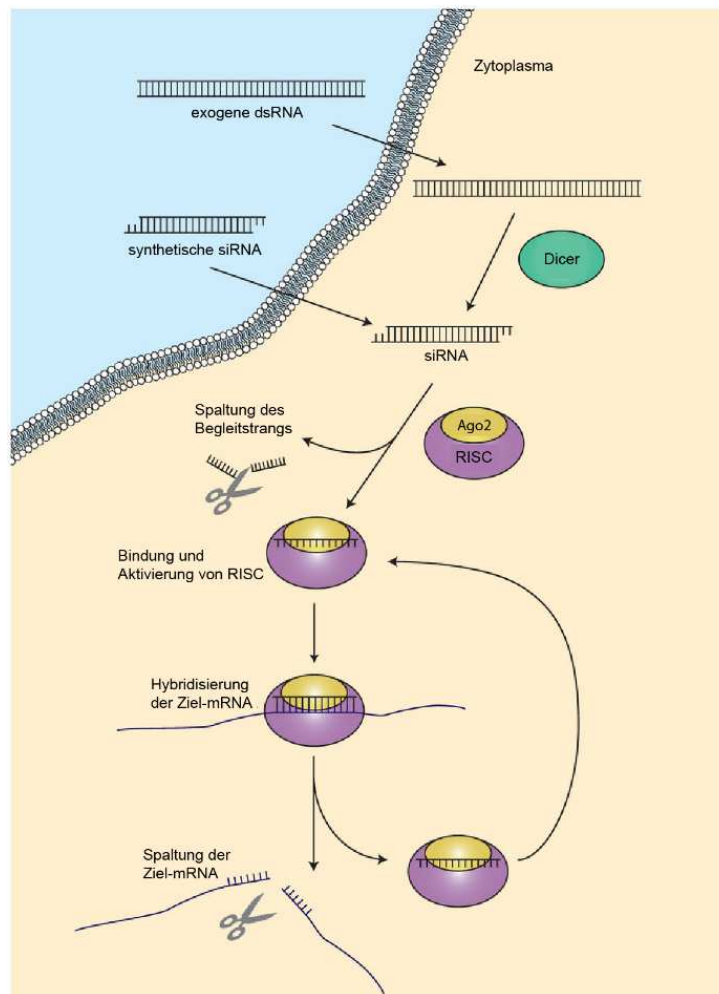


Abbildung 1.2 RNA-Interferenz. Lange doppelsträngige dsRNA wird im Zytoplasma von dem Enzym Dicer zu einem 21 bis 23 bp langen RNA-Fragment mit einem 3'-Überhang von 2 nt prozessiert. Eine synthetische siRNA initiiert dieses RNA-Produkt von Dicer. Der Leitstrang bindet an RISC, während der Begleitstrang von Ago2 gespalten wird. Die zu dem Leitstrang komplementäre mRNA wird von dem Komplex erkannt und gespalten, sodass die Translation dieser mRNA verhindert wird. Adaptiert von Kanasty et al. [59].

1.6 Prinzip der bifunktionellen 5'-Triphosphat-siRNA

Die ausgeprägte Plastizität und Heterogenität von Tumorzellen stellt einerseits eine entscheidende Ursache für die Resistenz gegenüber zielgerichteten Therapiestrategien dar [60, 61], andererseits können sich diese Zellen so auch Immuntherapien entziehen [62]. Ferner zeigt die Kombination von tumorspezifischer Therapie und gleichzeitiger Aktivierung des Immunsystems bisher vielversprechende Ergebnisse [63-65]. Ein erfolgversprechender Ansatz bietet diesbezüglich die Verwendung von onkolytischen Viren, welche so verändert werden können, dass diese selektiv in Tumorzellen

replizieren, zu deren Zerstörung führen und darüber hinaus eine Immunantwort auslösen beziehungsweise verstärken, welche gegen den Tumor gerichtet ist [66].

Außerdem kann die Kombination von tumorspezifischer Therapie und gleichzeitiger Aktivierung des Immunsystems durch kurze doppelsträngige RNA-Moleküle hervorgerufen werden [58]. Hierfür werden diese kurzen dsRNA Moleküle durch eine Modifikation des 5'-Endes mit einem Triphosphat zu einem Liganden für RIG-I gemacht (siehe 1.2). Gleichzeitig kann die Sequenz so gewählt werden, dass mittels RNA-Interferenz (siehe 1.5) spezifisch eine mRNA abgebaut wird, welche von maßgeblicher Relevanz für das Tumorüberleben ist (siehe Abbildung 1.3). Es besteht die Möglichkeit diese beiden Prinzipien in einem Molekül, der bifunktionelle siRNA, zu vereinen, da beide Mechanismen im Zytoplasma stattfinden. Auch ist die Erkennung durch RIG-I weitgehend unabhängig von der vorliegenden RNA-Sequenz und bei den bisher analysierten bifunktionellen siRNA-Molekülen wurde von keiner Beeinträchtigung der RNA-Interferenz durch ein 5'-Triphosphat-Ende berichtet. Diese Methode konnte bereits in einigen Tumorentitäten im Mausmodell erfolgreich getestet werden. So führte eine *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) -spezifische 5'-Triphosphat-siRNA in Melanomzellen zu einer effektiven Apoptose [65]. Im Pankreaskarzinom führte eine 5'-Triphosphat-siRNA gegen *Transforming Growth Factor* (Tgf)- β_1 gerichtet ebenfalls zu einem ausgeprägten anti-tumorösen Effekt [67]. Weiterhin zeigte die bifunktionelle siRNA gegen das antiapoptotische Molekül Survivin in Lungentumorzellen [68] ebenso wie gegen das Enzym Glutaminase in verschiedenen Tumorzellen [69] einen vielversprechenden therapeutischen Effekt.

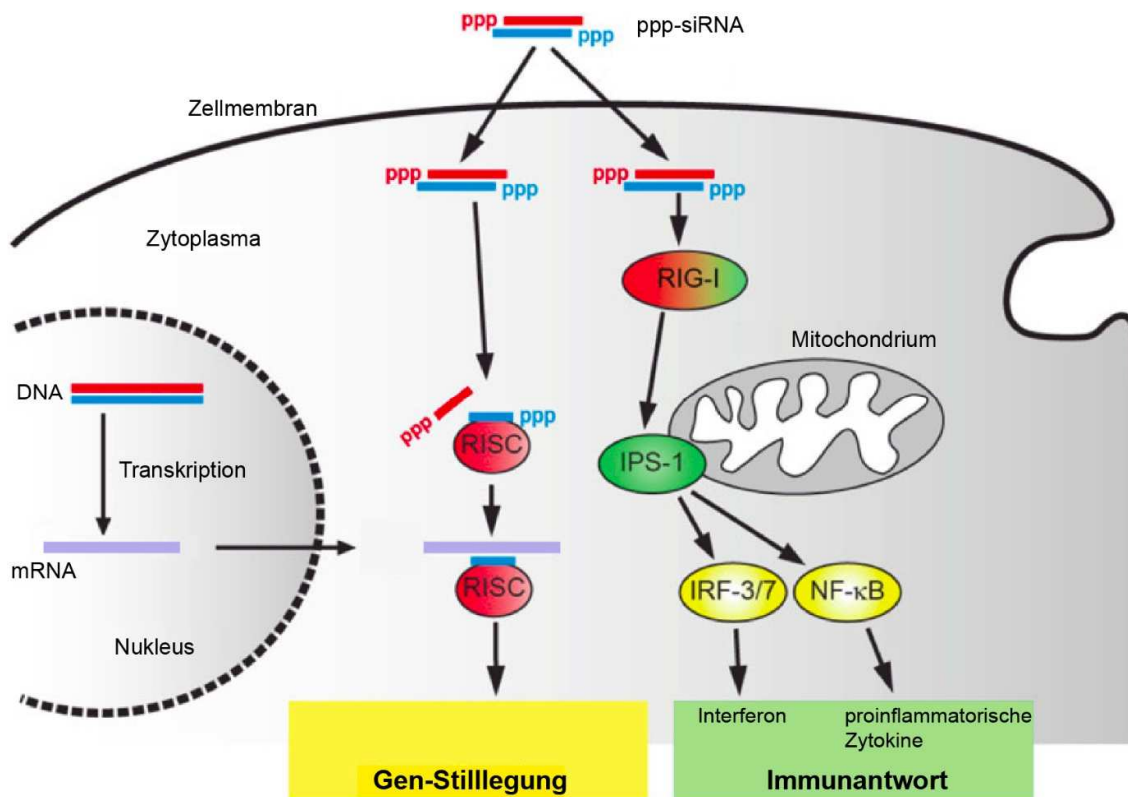


Abbildung 1.3 Durch bifunktionelle ppp-siRNA ausgelöste Wirkmechanismen. Im Zytoplasma wird die ppp-siRNA in den RISC-Komplex eingebaut und ermöglicht die Bindung der zum Leitstrang komplementären mRNA. Diese wird von dem Komplex gespalten, und dadurch die Translation der mRNA verhindert. Außerdem aktiviert ppp-siRNA RIG-I, was über den Adapter IPS-1/MAVS eine antivirale Immunantwort auslöst. Adaptiert von Matheis und Besch [70].

1.7 Akute Myeloische Leukämie (AML)

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Erkrankung myeloischer Progenitor- oder Stammzellen. Der proliferierende Klon verdrängt das gesunde Knochenmark und somit die normale Hämatopoese, mit den daraus resultierenden Konsequenzen einer Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie.

1.7.1 Pathogenese und molekulargenetische Veränderungen

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass es sich bei der Entstehung der AML um eine mehrstufige Pathogenese handelt [71]. Es konnten eine Reihe von genetischen Läsionen identifiziert werden, welche einen Einblick in die ausgeprägte molekulare Heterogenität und in die Pathogenese der Erkrankung ermöglichen [72]. Oft können

mehrere genetische Veränderungen bei einem Patienten nachgewiesen werden, die häufigsten Mutationen finden sich in den Genen *fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3), *nucleophosmin 1* (NPM1), DNA-Methyltransferase 3A (DNMT3A), *runt-related transcription factor 1* (RUNX1; siehe Tabelle 1.1). Die bei AML betroffenen Gene demonstrieren das umfangreiche Spektrum der potenziell betroffenen zellulären Prozesse, sodass neben der Differenzierung und der Proliferation auch die epigenetische Regulation, das RNA-Splicing oder die DNA-Reparatur beeinträchtigt sein können. Außerdem weisen diese Genmutationen eine wichtige prognostische Funktion auf [73-76]. Bisher haben jedoch nur einige genetische Analysen zur Diagnostik, wie die Zytogenetik und das Screening nach ausgewählten Genmutationen, Eingang in die klinische Praxis gefunden [76].

Tabelle 1.1 Mutationen in AML Patienten

Gen-mutationen	AML Patienten mit Mutation [%] ^a
FLT3	39
NPM1	33
DNMT3A	31
NRAS	22
RUNX1	15
TET2	15
IDH2	14
TWT1	13
ASXL1	11
PTPN11	10
SRSF2	10
TP53	9
CEBPA	8
IDH1	7
CBCOR	7
KMT2A-PTD	6
KRAS	6
SRAG2	6
RAD21	5

^a Informationen aus Metzeler et al. [72].

1.7.2 Therapiestandards der AML

Die Therapie der AML teilt sich auf in Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie. Die Basis der Induktionstherapie stellt das sogenannte 3+7 Schema dar,

welches die dreitägige Applikation eines Antrazyklins mit einer siebentägigen Dauerinfusion von Cytarabin kombiniert [77]. Anschließend wird bei jüngeren Patienten eine Konsolidierungstherapie mit einer hohen Dosis Cytarabin durchgeführt, alternativ besteht die Möglichkeit einer allogenen oder autologen Stammzelltransplantation. Sowohl die Wahl der Dosis des Cytarabins als auch die Entscheidung, eine Stammzelltransplantation in der Primärtherapie durchzuführen, ist vor allem abhängig vom genetischen Profil der AML, der Spenderverfügbarkeit und des Allgemeinzustandes des Patienten [76]. Die 5-Jahres-Überlebensrate mit der oben skizzierten Standardtherapie ist stark altersabhängig und beträgt bei Patienten unter 30 Jahren bei Erstdiagnose 60%, zwischen 45 und 54 Jahren 43%, zwischen 55 und 64 Jahren 23% und sinkt in höherem Alter weiter deutlich [78]. Die hohe Rezidivrate in Leukämiepatienten ist auf die Existenz einer seltenen Population an leukämischen Stammzellen (*leukemic stem cell*, LSC) zurückzuführen, welche der zytostatischen Therapie entgehen kann [79, 80].

1.7.3 Neue molekulare Therapiestrategien

Die Therapie der AML stützt sich wie oben beschrieben hauptsächlich auf Chemotherapeutika. Jedoch befinden sich auch neue Therapieansätze in der klinischen Entwicklung, die sich an der molekularen Pathogenese der AML orientieren. So sind beispielsweise Inhibitoren von FLT3 [81], DNA-Methyltransferase (DNMT) [82], *bromodomain and extraterminal domain* (BET) [83] und Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) 1 und 2 [84, 85] mögliche neue Ansätze einer spezifischen Therapie der AML. Zudem hat auch das Aufkommen der Immuntherapie neue Behandlungsmöglichkeiten aufgeworfen. Allerdings ist die Übertragung bereits bestehender Konzepte der Immuntherapie aus anderen onkologischen Bereichen auf die AML einigen Hindernissen unterworfen, da es bisher keine möglichen Ziel-Antigene gibt, die als Einzeltarget spezifisch für die Leukämiezellen sind und nicht auf essentiellen weiteren Körperzellen vorkommen. Trotzdem ist ein gewisser Erfolg in einigen Teilbereichen der Immuntherapie der AML zu verzeichnen [86]. So bieten beispielsweise Chemoimmunkonjugate eine vielversprechende neue Therapiemöglichkeit. Hierbei wird ein Toxin zur selektiven Aufnahme mit einem Antikörper verknüpft, welcher im Fall der AML gegen die Oberflächenantigene *cluster of differentiation* 33 (CD33) oder auch CD123 gerichtet ist [87-90]. Ebenso stellen Antikörperkonstrukte, die T-Zellen zu einer gezielten Immunantwort gegen AML-Zellen rekrutieren, eine neue Kategorie an Molekülen mit potentieller Verwendung in der Immuntherapie, dar [91, 92]. Bei diesen sogenannten *Bi-specific T-cell engagers*

(BiTE) Antikörpern werden zwei unterschiedliche *single chain variable fragments* (scFv) Fragmente mit einer kurzen Peptidbrücke verbunden, sodass zum einen der T-Zell-Rezeptor und zum anderen ein Tumor-assoziiertes Antigen gebunden werden, was die betreffenden Zellen in unmittelbare Nachbarschaft bringt.

1.8 Prinzip der DNA-basierten Nanopartikel

DNA-Nanotechnologie bietet die Möglichkeit artifizielle dreidimensionale Strukturen unter Verwendung von definierten DNA-Molekülen präzise herzustellen. Dabei macht man sich die komplementäre Basenpaarung der DNA-Stränge zu Nutze, sodass sich einzelne definierte Abschnitte durch Hybridisierung zusammen lagern und so eine komplexe, präzise räumlich definierte Struktur im Nanometerbereich bilden können [93-98]. Diese DNA-basierte Technologie bietet aus mehreren Gründen eine vielversprechende neuartige Strategie für den Transport von Molekülen. So können sowohl Größe als auch Form der Nanopartikel exakt festgelegt werden und zudem besteht die Möglichkeit etwaige Modifikationen mit verschiedenen biochemischen Anteilen vorzunehmen. Neben der bestehenden Monodispersität handelt es sich darüber hinaus bei DNA um biologisches Material, sodass eine hohe Biokompatibilität gegeben ist [94, 96, 99-101]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass die DNA-Nanotechnologie den Transport für diverse Moleküle ermöglichen kann, wie beispielsweise für das Zytostatikum Doxorubicin [102-104], für Antikörper [105], für Immunstimulatoren [101, 106-108] oder für siRNA-Moleküle [109]. Es gibt zur Herstellung von DNA-basierten Nanopartikel unterschiedliche Ansätze, unter anderem die *single-strand tile* (SST) -Methode, welche näher unter 2.1.6 dargestellt wird. Durch die große Auswahl an potenziellen DNA-Sequenzen und -Längen kann eine Vielzahl an möglichen Strukturen der Nanopartikel gestaltet werden, wie etwa Tetraeder [110], Oktaeder [111], flache Platten [96, 112], Röhren [113, 114] oder würfelförmige Strukturen [115]. Von besonderer Relevanz in Bezug auf eine mögliche Anwendung der DNA-basierten Nanopartikel ist ihre Fähigkeit als Gerüst für spezifische Modifikationen zu fungieren. Über diese Modifikationen können DNA-Partikel mit Liganden für Zell-spezifische Rezeptoren verknüpft werden, sodass mithilfe dieser Liganden ein zielgerichteter Transport in bestimmte Zellen ermöglicht werden kann. Diese Liganden sollten verschiedenen Funktionalitäten erfüllen: Zunächst sollte die mittels Nanopartikel transportierte Fracht zielgerichtet zur gewünschten Zelle gelangen, woraufhin es zur

Aufnahme in die Zelle und der kontrollierten Freigabe dieser Fracht kommt. Als Liganden wurden Verbindungen untersucht, wie zellpenetrierende Peptide [116], Aptamere [117, 118] oder Folat [109]. Bei letztgenanntem handelt es sich um einen wirksamen und häufig genutzten Liganden, da viele Tumorzellen eine hohe Expression des Folatrezeptors aufweisen, um ihr Zellwachstum zu verbessern, während normale Zellen eine geringere Expression dieses Rezeptors zeigen [119, 120].

1.9 Fragestellung

Virale RNA stellt einen potenten Liganden des intrazellulären zytoplasmatischen Rezeptors RIG-I dar und dessen Aktivierung führt zur Ausschüttung antiviraler Botenstoffe. Elementar für die RNA-Erkennung durch RIG-I ist unter anderem eine minimale Länge von 18 bis 20 Basen sowie die Anwesenheit eines Triphosphats am 5'-Ende [14, 121]. Diese Eigenschaften können durch ein synthetisch hergestelltes Molekül imitiert werden und dadurch in pharmakologischer Absicht eine antivirale Immunantwort ausgelöst werden. Auch eine siRNA besteht aus einem kurzen doppelsträngigen RNA-Molekül, welches mittels RNA-Interferenz den *Knock-down* eines festgelegten Gens initiiert. Die Kombination von RIG-I-Aktivierung und spezifischer RNA-Interferenz durch eine therapeutische RNA bietet aus mehreren Gründen eine elegante neue Therapiestrategie. Einerseits teilen beide Moleküle, 5'-Triphosphat-RNA und siRNA, die strukturelle Anforderung der Doppelsträngigkeit und ein ähnliches Längenerfordernis. Andererseits finden beide Reaktionen im Zytoplasma statt. Dies ist vor allem für die Tumorthherapie ein interessantes Konzept. Tumorzellen scheinen per se eine höhere Sensitivität gegenüber RIG-I-vermitteltem Zelltod zu haben, und RIG-I-vermittelter Zelltod stellt eine immunogene Form des Zelltodes dar. Dies eröffnet die Möglichkeit eines therapeutischen Fensters mit dem Ziel durch RIG-I-Aktivierung eine tumorspezifische Immunantwort auszulösen [36, 122]. Durch die Wahl eines geeigneten siRNA-Targets im selben Molekül können selektiv tumorrelevante Gene stillgelegt werden, sodass der Effekt an nicht malignen Zellen minimiert werden kann. Dieses Prinzip konnte bereits mit vielversprechenden Ergebnissen in einigen Tumorentitäten, wie Melanom und Pankreaskarzinom, angewandt werden [65, 67-69]. Zur AML sind allerdings diesbezüglich keine Daten bekannt, daher fokussiert sich diese Arbeit auf die Evaluation bifunktioneller siRNAs in der AML. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine Leukämieform mit schlechter Prognose, insbesondere bei höherem Erkrankungsalter

[78]. Mit der Kombination von RIG-I-Aktivierung und spezifischem Gen-*Knock-down* bietet sich bei dieser molekular- und zytogenetisch sehr heterogenen Erkrankung die Möglichkeit einer personalisierbaren Therapieoption [42-44].

Bei systemischer Applikation kurzer RNA-Stränge ist mit einigen Schwierigkeiten zu rechnen. Hierzu zählen insbesondere die Instabilität in der Blutbahn, die schnelle Ausscheidung und die geringe zelluläre Aufnahme. Derzeit wird versucht dem entgegen zu wirken indem die siRNA mithilfe von unterschiedlichen Carriern transportiert wird. Hierfür kann die RNA entweder mit positiv geladenen Vektoren (beispielsweise Polymeren oder Lipiden) komplexiert werden oder auch mit *small molecules* konjugiert werden. Gegenstand aktueller Forschung sind außerdem verschiedene neuartige Transportmechanismen zur Überwindung dieser Hindernisse, einer davon beschäftigt sich mit DNA-basierten Nanopartikeln. Diese Nanopartikel, ausgestattet mit Folat-Liganden zur zielgerichteten Aufnahme, bieten eine vielversprechende neue Strategie für den spezifischen intrazellulären Transport von Molekülen, da sie potentiell verschiedene Barrieren der zytoplasmatischen Aufnahme, wie beispielsweise die Penetration der Zellmembran oder das Freilassen aus dem Endosom, überwinden können [109].

Ziel dieser Arbeit ist es daher bifunktionelle siRNA als neue Therapiemöglichkeit in AML-Zelllinien zu evaluieren. Dabei wurde zunächst die zentrale Frage nach geeigneten Zielgenen einer siRNA in Kombination mit RIG-I-Aktivierung bearbeitet. Des Weiteren wurde die Möglichkeit, DNA-basierte Nanopartikel zum Transport von RNA-Molekülen zu verwenden, evaluiert.

Folgende spezifische Fragestellungen wurden dafür bearbeitet:

- Welche Folgen hat eine Aktivierung von RLR auf die Ausschüttung von Zytokinen, die Apoptoseinduktion und die Zellviabilität in AML-Zellen?
- Welche der AML-relevanten Gene sind potentielle Targets einer ppp-siRNA?
- Was sind die Auswirkungen einer Kombination von RIG-I-Aktivierung und spezifischem *knock-down* auf *knock-down*-Effizienz, Aktivierung von RIG-I und letztendlich Zellviabilität der AML-Zellen?
- Besteht die Möglichkeit siRNA-Moleküle mithilfe von DNA-basierten und Folat-konjugierten Nanopartikeln in das Zytoplasma zu transportieren?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte

<i>Alpha Imager HP</i>	Alpha Innotech (San Leandro, CA, USA)
Begasungsbrutschrank (BD 6220)	Heraeus (Hanau, DE)
<i>CELLview</i> Zellkulturschale mit Glasboden	Greiner bio-one (Frickenhausen, DE)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, DE)
<i>FACSCalibur</i>	BD Biosciences (Heidelberg, DE)
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Konfokalmikroskop Leica TCS SP5	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)
Kühl-, Gefrierschränke (4°C, -20°C)	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, DE)
<i>Lamin Air Flow</i> (HB 2448)	Heraeus (Hanau, DE)
<i>LAS-4000 mini luminescent image analyzer</i>	Fuji Film (Tokyo, JP)
<i>LightCycler</i> 480 II	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
Mikroskop	Zeiss (Jena, DE)
Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser	Berthold Tech. (Bad Wildbad, DE)
Multi- <i>well</i> -Platte	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Nanodrop ND-1000	NanoDrop (Wilmington, USA)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht (Balgach, DE)
pH-Meter SB70P sympHony	VWR (Darmstadt, DE)
<i>Power Pac</i> 200 Spannungsgerät	Biorad (München, DE)
<i>Thermocycler T3</i>	Biometra (Göttingen, DE)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg, DE)
<i>Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell</i>	Biorad (München, DE)
Vortexer	Janke & Kunkel (Staufen, DE)
Waage LP 6209	Sartorius (Göttingen, DE)

Waage SBC 21	Scaltec Instruments (Heiligenstadt, DE)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifuge Multifuge 3L-R	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Heraeus (Hanau, DE)

2.1.2 Reagenziensätze

<i>Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
<i>CellTiter-Blue cell viability reagent</i>	Promega (Madison, USA)
<i>Human IP-10 ELISA Set</i>	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
<i>LightCycler 480 Probes Master</i>	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
<i>MEGAShortscript T7 Kit</i>	Ambion (Darmstadt, DE)
<i>RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Thermo Scientific (Waltham, USA)
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Quiagen (Venlo, NL)
<i>Universal Probe Library Set, human</i>	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Zellkultur

<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun (Melsungen, DE)
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Ciprofloxacin	Stada (Bad Homburg, DE)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), no phenol red</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
<i>Fetal calf serum (FCS)</i>	GibcoBRL (Paisley, GB)
Hoechst 33342 Fluoreszenz-Farbstoff	Pierce Bioscience (Bonn, DE)
L-Glutamin	PAA (Pasching, AT)
MCDB 153	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Opti-MEM (<i>Minimal Essential Medium</i>)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Penicillin / Streptomycin	PAA (Pasching, AT)
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	PAA (Pasching, AT)

2 Material und Methoden

Puromycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)	PAA (Pasching, AT)
1640 Medium	
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Trypsin, <i>sequencing grade</i>	Roche (Mannheim, DE)
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom (Berlin, DE)

Puffer

ELISA Coating Puffer

0,1 M Natriumcarbonat
in ddH₂O
pH 9,5

ELISA Assay Diluent

10 % FCS
in PBS
pH 7,0

ELISA Waschpuffer

0,05 % Tween-20
in PBS

Transfection Buffer (HEPES buffered saline, HBS)

150 mM NaCl
5 mM KCl
0,7 mM Na₂HPO₄
5,5 mM D-Glucose
21 mM HEPES
In ddH₂O

Zellkulturmedien

DMEM-Vollmedium

100 IU/ ml Penicillin
100 µg/ ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
10 % FCS
in DMEM-Medium

RPMI-Vollmedium

100 IU/ ml Penicillin
100 µg/ ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
10 % FCS
in RPMI 1640 Medium

RPMI-Medium für Transfektion

1,5 mM L-Glutamin

10 % FCS

in RPMI 1640 Medium

Transfektion

<i>Lipofectamine</i> 2000	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<i>Lipofectamine RNAiMax</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Poly(I:C), HMW	Invivogen (San Diego, USA)

Zellyse

70 % Ethanol

ELISA

<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Roth (Karlsruhe, DE)
Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat	Roth (Karlsruhe, DE)

In vitro Transkription

Chloroform	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol absolut	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
<i>Mini Quick Spin Columns</i>	Roche (Mannheim, DE)
<i>MinElute Gel Extraction Kit</i>	Quiagen (Hilden, DE)
Phenol-Chloroform	Roth (Karlsruhe, DE)
UTP-Biotin	TriLink (San Diego, CA, USA)

Transduktion

Calciumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Polybrene	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Enzyme

Desoxyribonucleotide	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
Klenow Fragment, exo-	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
RNase-Inhibitor	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
Trypsin, <i>Sequencing Grade</i>	Roche (Mannheim, DE)

2 Material und Methoden

Organellen-Staining

Dextran, Alexa Fluor 488	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Dextran, Alexa Fluor 647	Thermo Scientific (Waltham, USA)
<i>MitoTracker Green</i>	Thermo Scientific (Waltham, USA)
<i>ER-Tracker Green</i>	Thermo Scientific (Waltham, USA)

2.1.4 Sequenzen von RNAs, DNA-Templates, RNA-Oligonukleotiden und qPCR-Primern

Tabelle 2.1 RNA

Ziel-mRNA	Name	Sequenz (5' → 3') ^a
AML1-ETO	siAML1-ETO_7+12	CCUCGAAAUCGUACUGAGA
	siAML1-ETO_14+5	CCGAGAACCUCGAAAUCGU
BRD4	siBRD4_1880	GGAAAGAGGAAGUGGAAGA
	siBRD4_2442	CCAGCAAGCUAUAGCUUAA
CDX2	siCDX2_910	CCAGGACGAAAGACAAAUA
	siCDX2_1087	GGAAAAUCAACAAGAAGAA
FLT3	siFLT3_1313	CCAGCCAGGAGAAUAUAUA
	siFLT3_2301	CAAGAGAAGUUCAGAUACA
	siFLT3_mut	AUGAAUAUGAUCACGUUGA
GFP	siGFP	GCCACAACGUCUAUAUCAU
MCL1	siMCL1_670	CAGUACGGACGGGUCACUA
	siMCL1_735	GGCAGUCGCUGGAGAUUAU
	siMCL1_3989	GGACCAACUACAAAUAUAU
NPM1	siNPM1_602	GGAGGAAGAUGCAGAGUCA
	siNPM1_1375	GGUGGUCAGACAUGGAAAU
	siNPM1_mut	CUGUCUGGCAGUGGAGGAA
PLK1	siPLK1_1069	CCCUCACAGUCCUCAUAUA
	siPLK1_1424	AGAUCACCCUCCUUAUAUA
WT1	siWT1_826	CUAUUCGCAAUCAGGGUUA
	siWT1_1424	CUGUGAACGAAGGUUUUCU
-	ctrl-siRNA	GCGCUAUCCAGCUUACGUA
-	AF 488 RNA	UCAAACAGAGGUCGCAUGC

^a Dargestellt ist die Sequenz im Sense-Strang der Ziel-mRNA. Die siRNA wurden unter Verwendung des WI siRNA-Selektionsprogramms [123] designiert und anschließend von Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.2 DNA- Templates zur IVT

Name	Sequenz (5' → 3') ^a
Template ppp-siBRD4 <i>sense</i>	TTAAGCTATAGCTTGCTGGTATAGTGAGTCG
Template ppp-siBRD4 <i>antisense</i>	CCAGCAAGCTATAGCTTAATATAGTGAGTCG
Template ppp-siFLT3 <i>sense</i>	TATATATTCTCCTGGCTGGTATAGTGAGTCG
Template ppp-siFLT3 <i>antisense</i>	CCAGCCAGGAGAATATATATATAGTGAGTCG
T7-Promotor-Primer Ambion	TAATACGACTCACTATA

^a DNA- Templates wurden von Metabion (Planegg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.3 RNA-Oligonukleotide zur Zellstimulation

Typ ^a	Modifikation	Name	Sequenz (5' → 3')
syn	5'-OH	OH-RNA	GCGCUAUCCAGCUUACGUA
syn	5'-OH	OH-siBRD4	UUAAGCUAUAGCUUGCUGG
syn	5'-OH	OH-siFLT3	UAUAUAUUCUCCUGGCUGG
IVT	5'-ppp	ppp-siBRD4 <i>sense</i>	CCAGCAAGCUAUAGCUUAA
IVT	5'-ppp	ppp-siBRD4 <i>antisense</i>	UUAAGCUAUAGCUUGCUGG
IVT	5'-ppp	ppp-siFLT3 <i>sense</i>	CCAGCCAGGAGAAUAUAUA
IVT	5'-ppp	ppp-siFLT3 <i>antisense</i>	UAUAUAUUCUCCUGGCUGG

^a Chemisch synthetisierte RNA (syn) wurde von Metabion (Planegg, Deutschland) bezogen.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.4 qPCR-Primer

Zielgen	Primer	Sequenz (5' → 3') ^a	Sonde ^a
AML1-ETO	<i>forward</i>	ACAAACCCACCGCAAGTC	#21
	<i>reverse</i>	TGGAGTGCCTTCTCAGTACGATT	#21
BRD4	<i>forward</i>	AGTCGGAGAGCTCCAGTGAG	#17
	<i>reverse</i>	TGTCCAATGATTAGGCAGGAC	#17
CDX2	<i>forward</i>	ATCACCATCCGGAGGAAAG	#34
	<i>reverse</i>	TGCGGTTCTGAAACCAGATT	#34
FLT3	<i>forward</i> (wt)	CTCAAATGGGAGTTTCCAAGAG	#33
	<i>forward</i> (mut)	GAATATGATCACGTTGATTTTCA	#33
	<i>reverse</i>	CCCCAGCAGGTTTACAATA	#33
GFP	<i>forward</i>	GAAGCGCGATCACATGGT	#67
	<i>reverse</i>	CCATGCCGAGAGTGATCC	#67
HPRT	<i>forward</i>	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	#73
	<i>reverse</i>	CGAGCAAGACGTTTCACTCCT	#73
IP-10	<i>forward</i>	GAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGT	#34
	<i>reverse</i>	GACATATACTCCATGTAGGGAAGTGA	#34
MCL1	<i>forward 1</i>	AAGCCAATGGGCAGGTCT	#04
	<i>reverse 1</i>	GAAGTCCACAAACCCATCCTT	#04
	<i>reverse 2</i>	TGTCCAGTTTCCGAAGCAT	#04
MDA5	<i>forward</i>	AGGCACCATGGGAAGTGAT	#36
	<i>reverse</i>	GGTAAGGCCTGAGCTGGAG	#36
NPM1	<i>forward</i>	GCGCCAGTGAAGAAATCTAT	#19
	<i>reverse</i> (wt)	CTTCCTCCACTGCCAGAGAT	#19
	<i>reverse</i> (mut)	CTTCCTCCACTGCCAGACAG	#19
PLK1	<i>forward</i>	CACAGTGTCAATGCCTCCA	#30
	<i>reverse</i>	TTGCTGACCCAGAAGATGG	#30
RIG-I	<i>forward</i>	TGGACCCTACCTACATCCTGA	#69
	<i>reverse</i>	GGCCCTTGTTGTTTTTCTCA	#69
WT1	<i>forward</i>	AGCTGTCCCACTTACAGATGC	#04
	<i>reverse</i>	CCTTGAAGTCACACTGGTATGG	#04

^a Die qPCR-Primer wurden unter Verwendung des online *Assay Design Centers* von Roche design, mit einer geeigneten Sonde kombiniert und anschließend von Metabion (Planegg, Deutschland) bezogen.

2.1.5 Zelllinien

Tabelle 2.5 Zelllinien

Zelllinie	Zellart	DSMZ	für diese Arbeit relevanten Mutation
Kasumi-1	AML FAB M2	# 220	Translokation (8;21) (q22;q22) mit Entstehung des Fusionsgens AML1-ETO
MV4-11	AML FAB M5	# 102	FLT3 interne Tandemduplikation
OCI-AML3	AML FAB M4	# 582	NPM1 Exon 12
PL-21	AML FAB M3	# 536	FLT3 interne Tandemduplikation
THP-1	AML FAB M5	# 16	
HeLa	Zervixkarzinom	# 57	
A549	Adenokarzinom der Lunge	# 107	
Phoenix-AMPHO	Embryonale Nierenzellen	-	

AML Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Subklewe (LMU München) bereitgestellt. Die anderen Zelllinien wurden von ATCC (Manassas, USA) bezogen.

2.1.6 Design der DNA-basierten Nanopartikel

Die hier verwendeten Nanopartikel wurden mit Hilfe der SST-Methode [113] hergestellt und freundlicherweise von Samet Kocabey und Prof. Liedl (LMU München) zur Verfügung gestellt. Diese Nanopartikel, bestehend aus sechs Helices, wurden aus 24 DNA-Oligonukleotiden gefertigt. Jedes Oligonukleotid war 42 Basen lang und beinhaltete vier Domänen, welche zehn beziehungsweise elf Basen umfassten (siehe Abbildung 2.1 A). Die Sequenzen dieser vier Domänen wurden so gewählt, dass sie jeweils komplementär zueinander waren und so durch Basenpaarung ein netzartiges Gebilde entstand (siehe Abbildung 2.1 B). Mithilfe von weiteren DNA-Einzelsträngen entstand durch Zusammenlagerung ein röhrenförmiger Nanopartikel.

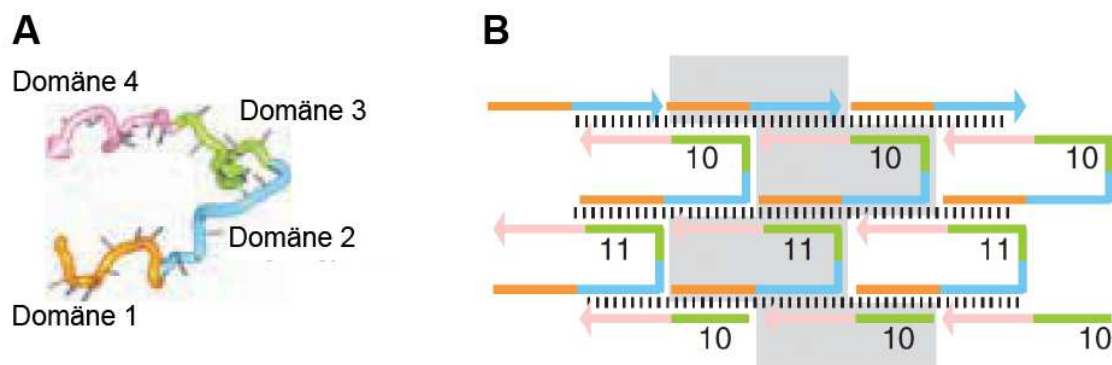


Abbildung 2.1 Single-strand-tile-Methode. (A) Darstellung des Motivs der Oligonukleotide. Jede Farbe repräsentiert eine Domäne. (B) Darstellung der Sekundärstruktur des DNA-Netzkes. Kurze schwarze Striche repräsentieren die Basenpaarung. Die grau hinterlegte Fläche stellt eine sich wiederholende Einheit dar. Adaptiert von Yin et al. [113].

An sechs der 24 Oligonukleotide wurden mittels Click-Reaktion PEG-Folat-Azide konjugiert (siehe Abbildung 2.2). Weitere sechs Oligonukleotide wurden um 18 Nukleotiden verlängert, um so eine Anlagerung durch Hybridisierung von sechs siRNA-Strängen zu ermöglichen. Zur Visualisierung und Detektion der Nanopartikel wurden zwei verschiedene Ansätze zum Anheften von Fluorochromen verwendet. Bei einer Variante wurden 12 Oligonukleotide am 3'-Ende enzymatisch mithilfe einer Transferase mit Atto 488-dUTP markiert. Bei der anderen Variante wurden diese Oligonukleotide um weitere 18 Nukleotide verlängert und anschließend mit 12 mittels N-Hydroxysuccinimid (NHS) -Chemie Atto 647-markierten Oligonukleotiden durch Basenpaarung hybridisiert. Die hier verwendeten Nanopartikel waren circa 27 nm lang und hatten etwa einen Durchmesser von 6 nm [124].

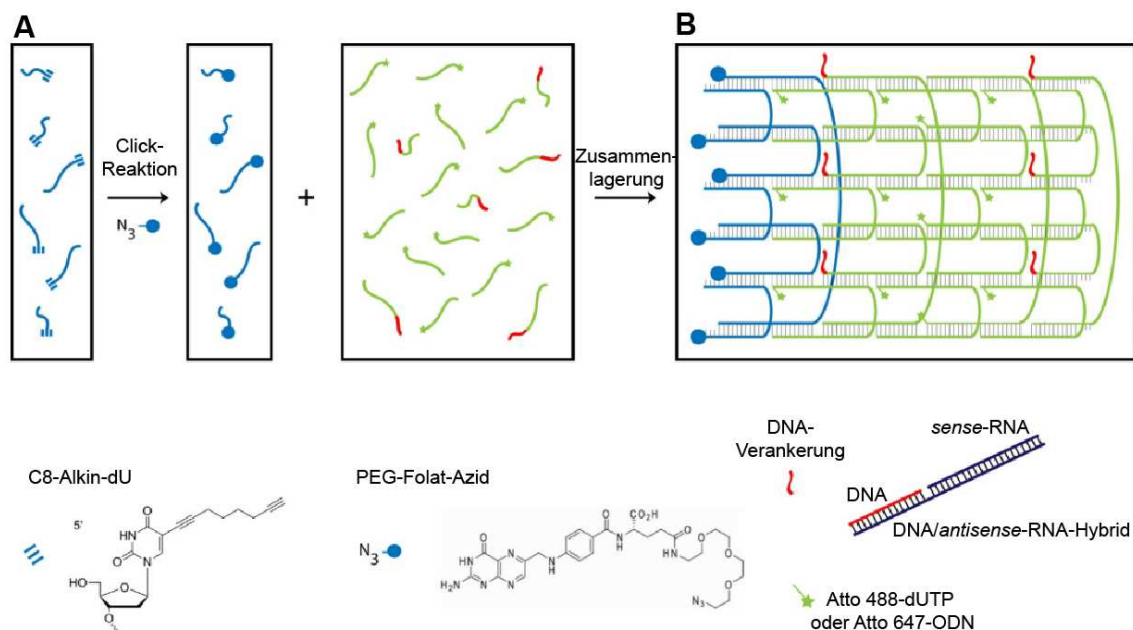


Abbildung 2.2 Herstellung der röhrenförmigen DNA-Nanopartikel. (A) Click-Reaktion der Alkin-modifizierten Oligonukleotide mit dem Azid-modifizierten PEGyliertem Folat. (B) Annealing-Prozess über 17h führt zur Zusammenlagerung von 24 Oligonukleotiden und zur Entstehung eines röhrenförmigen Nanopartikels, bestehend aus sechs Helices. Adaptiert von Kocabey et al. [124].

2.1.7 Software

Adobe Illustrator
Adobe Photoshop
EndNote Library
FlowJo Tree Star
GraphPad
Microsoft Office

Adobe Systems (San Jose, USA)
Adobe Systems (San Jose, USA)
Thomson Reuters (New York City, USA)
FlowJo (Ashland, USA)
GraphPad Software Inc. (California, USA)
Microsoft (Redmont, USA)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Sämtliche Experimente mit Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Air Flow, mit Ausnahme der Versuche unmittelbar vor und während der FACS-Analysen.

2.2.2 Kultivierung von Tumorzelllinien

AML-Zelllinien wurden in Kulturflaschen der Größe 75 cm² gehalten. Als Kulturmedium wurde für alle humanen AML-Zelllinien RPMI-Vollmedium, für alle adhärenenten Zelllinien wurde DMEM-Vollmedium verwendet. Angepasst an das unterschiedliche Wachstum der einzelnen Zelllinien wurden alle zwei bis vier Tage überschüssige Zellen verworfen und mit frischem Medium aufgefüllt. Mithilfe des Lichtmikroskops wurde der Zustand der Zellen bezüglich Zelldichte, Infektionen und Zelltod untersucht.

2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Ermittlung des Anteils der lebenden Zellen wurde die zu untersuchende Zellsuspension mit Trypanblau versetzt. Hierbei handelt es sich um eine Substanz, welche von abgestorbenen und perforierten Zellen aufgenommen wird und so zu einer dunkelblauen Färbung führt. Die Zahl der lebenden Zellen wurde anschließend in geeigneter Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

2.2.4 Transfektion von Zellen

Transfektion mittels Lipofektion

Damit siRNAs, 5'-Triphosphat-RNAs oder poly(I:C) in das Zytoplasma von Zellen gelangen, wird üblicherweise eine Komplexierung mit Transfektionsreagenzien durchgeführt. Hierbei wird das zu transfizierende Molekül in einen liposomenartigen Vesikel eingeschlossen, sodass dieser mit der Zellmembran der Zielzelle fusionieren kann und den Inhalt in das Innere der Zelle freigibt.

Bei AML-Zellen wurden zur Durchführung dieser Lipofektion die Tumorzellen zunächst in 30 µl Kulturmedium ohne Antibiotika in 96-well-Platten ausplattiert, je nach Fragestellung 10.000, 30.000 bzw. 60.000 Zellen pro well. Die Zellen wurden dann mit 60 ng siRNA, mit 5'-Triphosphat-RNA oder poly(I:C) von Konzentrationen zwischen 1000 und 3000 ng/ml transfiziert. Hierfür wurden 1,5 µl *Lipofectamine RNAiMAX* nach dem Protokoll von Invitrogen verwendet. Die Effizienz dieser transienten Transfektion wurde mithilfe einer mit Alexa Fluor (AF) 488 gelabelten RNA mit vergleichbarer Länge überprüft. Dies wurde nach vier Stunden mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.4.1) bestimmt.

Zur Transfektion von RNA mittels Lipofektion in adhärenente Zellen wurden hierfür 10.000 Zellen in *CELLview* Zellkulturschalen (Wachstumsfläche 1,9 cm²) 24 Stunden

zuvor ausplattiert. Nach dem Entfernen des Kulturmediums und dem Waschen der Zellen mit PBS wurde die siRNA in einer Konzentration von 500 ng/ml transfiziert. Hierfür wurde 1 µl *Lipofectamine RNAiMAX* nach dem Protokoll von Invitrogen verwendet.

Transfektion mithilfe von Elektroporation

Bei der Elektroporation handelt es sich um ein Verfahren, das Zellmembranen mithilfe eines elektrischen Felds kurzzeitig permeabel macht indem durch Umlagerung der Membranlipide Poren entstehen. Dadurch können Substanzen wie kleine RNA- oder DNA-Moleküle im Außenmedium durch die Zelle aufgenommen werden.

Die AML-Zellen wurden hierfür zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Kulturmedium ohne Zusätze resuspendiert. Für die Elektroporation wurden entweder 200 oder 400 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ /ml in eine 4 mm Küvette gegeben. Die Elektroporation wurde für 10 ms bei 350 V mit dem Puls „square“ mithilfe eines Elektroporators durchgeführt. Es wurden 100 nM siRNA oder 240 nM ppp-RNA oder poly(I:C) eingesetzt. Die Zellen wurden im Anschluss daran umgehend in 2 bis 3 ml Vollmedium mit der Temperatur 37 °C resuspendiert. Auch hier wurde die Effizienz der Transfektion mittels einer mit AF 488 gelabelten RNA und die Zellviabilität nach Elektroporation mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.4.1) überprüft.

2.2.5 Immunstimulation von Zellen

Bei der Stimulation von AML-Zelllinien wurde entweder 5'-Triphosphat-RNA oder poly(I:C) mittels Transfektion in den oben beschriebenen Konzentrationen transfiziert. Nach 24 beziehungsweise 48 Stunden wurde der zellfreie Überstand zur Messung der Konzentrationen von IP-10 mittels ELISA (siehe 2.3.5) abgenommen. Die RNA-Isolation erfolgte nach 24 Stunden. Die Zellviabilität wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* (siehe 2.2.6) bestimmt.

2.2.6 CellTiter-Blue Cell Viability Assay

CellTiter-Blue Cell Viability Assay ist eine Fluoreszenzmessmethode zur Bestimmung der Zellviabilität. Hierbei wird die metabolische Kapazität der Zellen mithilfe des Indikatorfarbstoffes Resazurin gemessen. Dieser Redox-Farbstoff wird von wachstumsfähigen Zellen reduziert und zu Resorufin umgesetzt, welches bei 590 nm Fluoreszenz

emittiert. Dieses Fluoreszenzsignal ist proportional zu der Anzahl an wachstumsfähigen Zellen.

Zur Beurteilung der Zellviabilität wurden nach einem *Knock-down* 1×10^4 und nach Immunstimulation je nach Fragestellung 1 bis 3×10^4 Zellen in 100 μ l Medium in 96-*well*-Platten ausplattiert. Vor der Auswertung zum gewünschten Zeitpunkt wurden je 20 μ l *CellTiter-Blue Reagent* hinzugegeben und nach vier Stunden konnte das Fluoreszenzsignal detektiert werden. Hintergrundfluoreszenz wurde mithilfe von Kontroll-*wells* auf jeder Platte korrigiert. Diese Kontroll-*wells* enthielten Kulturmedium und *CellTiter-Blue Reagent*, jedoch keine Zellen.

Der *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* wurde nach den Empfehlungen des Herstellers *Promega* verwendet.

Die Reduktion der Zellviabilität wurde mit nachfolgender Formel berechnet.

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{Fluoreszenz der Stimulation bzw. des Knock-downs}}{\text{Fluoreszenz der Kontrolle}} \right)$$

2.2.7 Retrovirale Transduktion

Zur Generierung einer Zelllinie, welche permanent das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) exprimiert, wurde die Methode der retroviralen Transduktion verwendet. Hierbei können virale Vektoren die gewünschte DNA-Sequenz in die Zielzellen einschleusen und diese in das Genom integrieren, sodass das entsprechende Protein dauerhaft exprimiert wird.

Der hier verwendete pMP71-Vektor beinhaltet die genetische Information für GFP sowie eine Resistenz für das Antibiotikum Puromycin. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von AG Endres/Kobold (LMU, München) zur Verfügung gestellt.

Die Virusproduktion und damit die Herstellung des viralen Vektors erfolgte mithilfe der Verpackungszelllinie Phoenix-AMPHO. Hierbei handelt es sich um 293T-Zellen, die ein Konstrukt beinhalten, welches die viralen Proteine *gag*, *pol* und *env* produziert und so die Herstellung der viralen Vektoren ermöglicht.

Diese Phoenix-AMPHO-Zellen wurden zunächst in 3 ml DMEM-Vollmedium in 6-*well*-Platten mit 1 , $1,25$ oder $1,5 \times 10^6$ pro *well* ausplattiert. Für die anschließende Transfektion wurden die *wells* mit der optimalen Konfluenz von 60 bis 70 % ausgewählt.

Transfektion des Vektors

DNA (Vektor)	18 µg
CaCl ₂ (2,5 M)	15 µl
H ₂ O	auf 150 µl auffüllen
<i>Transfection Buffer</i>	150 µl

Für diese Transfektion wurden Vektor-DNA und Calciumchlorid in Wasser gelöst und anschließend der *Transfection Buffer* unter kontinuierlichem Vortexen tröpfchenweise hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten erfolgte die vorsichtige Zugabe zu den Phoenix-AMPHO-Zellen; durch anschließendes Schwenken wurde eine gleichmäßige Verteilung sichergestellt. Nach weiteren 6 Stunden erfolgte ein vorsichtiger Wechsel des Mediums. 48 Stunden nach Transfektion wurde der Überstand geerntet und die Zellen mit 3 ml frischem Medium bedeckt. Die zu infizierenden Zellen, A549 und HeLa, wurden 24 Stunden zuvor in einer Dichte von 150.000 Zellen pro *well* in einer 6-*well*-Platte ausplattiert. Das Medium wurde unmittelbar vor der Infektion entfernt. Anschließend wurde das virushaltige Medium gefiltert und umgehend zusammen mit 8 µg/ml Polybrene auf diese Zellen gegeben. Die infizierten Zellen wurden zunächst expandiert und nach 5 Tagen mithilfe von Puromycin in Konzentrationen von 1, 3 und 5 µg/ml selektiert. Nach Selektion konnte durchflusszytometrisch ein Anteil von 93,1 % (HeLa-Zellen) beziehungsweise 20,3 % (A549-Zellen) GFP-positiven Zellen nachgewiesen werden. Daraufhin wurde durch *limiting Dilution* eine Einzelzellselektion durchgeführt und eine vollständige Expression von GFP durchflusszytometrisch gesichert.

2.2.8 Arbeiten mit Nanopartikeln

Zur Durchführung der Versuche mit Nanopartikeln wurden die Zellen zunächst ausplattiert (1 x 10⁴ Zellen für eine Auswertung mittels Konfokalmikroskopie und 5 x 10⁴ Zellen für eine anschließende FACS-Analyse, jeweils in 500 µl Medium in *CELLview* Zellkulturschalen). Nach 24 Stunden und Entfernung des Mediums erfolgte die Addition von 10 nM Nanopartikel in 100 µl Medium zu den Zellen, nach vier Stunden, um einer Austrocknung vorzubeugen, das Hinzufügen von weiteren 150 µl Medium. Die Aufnahme der Nanopartikel wurde anschließend mithilfe einer FACS-Analyse objektiviert und anhand des Konfokalmikroskops visuell dargestellt.

2 Material und Methoden

Zur Darstellung einer möglichen Folat-Abhängigkeit wurde mit HeLa-Zellen, welche Folat-Rezeptoren überexprimieren, und mit A549-Zellen, einer Zelllinie mit fehlenden Folat-Rezeptoren, gearbeitet. Diese Zellen wurden entweder in Folat-freiem oder Folat-haltigem Medium für 24 Stunden vor Zugabe der Nanopartikel in den *CELLview* Zellkulturschalen kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe entweder von Folat-gekoppelten Nanopartikel oder von Nanopartikeln ohne Folat-Verknüpfung. Die Aufnahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (zwischen zwei und 96 Stunden) sowohl mithilfe einer FACS-Analyse als auch anhand des Konfokalmikroskops beurteilt. Zur Analyse einer potenziellen Spaltung der nicht-kovalenten Bindung zwischen Nanopartikel und Liganden wurde der Nanopartikel mit unterschiedlichen Zellkultur-Medien zu den ausplattierten HeLa-Zellen gegeben. Hierbei kamen folgende Zellkultur-Medien zum Einsatz: DMEM-Vollmedium mit 10 % FCS, mit 5 % FCS, ohne FCS, DMEM-Vollmedium mit 10 % FCS, welches für 10 Minuten bei 90 °C inaktiviert wurde und Opti-MEM ohne Zusätze. Die Aufnahme der Nanopartikel wurde ebenfalls zu unterschiedlichen Zeitpunkten (zwischen vier und 24 Stunden) mittels Konfokalmikroskopie beurteilt.

2.2.9 Organellenfärbung

Zur genaueren Analyse der Lokalisation der Nanopartikel wurden verschiedene Zellorganellen angefärbt. Die Darstellung der Endosomen erfolgte mit Dextran, welches entweder mit AF 488 oder AF 647 markiert war. Hierbei handelt es sich um ein hydrophiles, verzweigtes Polysaccharid, welches durch Endozytose aufgenommen wird, in den Endosomen verbleibt und diese so markiert. Dextran wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml zeitgleich mit den Nanopartikeln auf die Zellen gegeben und für die Dauer des Versuchs im Zellkulturmedium belassen.

Zur Darstellung der Mitochondrien wurden diese nach dem Protokoll von Thermo Scientific mit dem *MitoTracker Green* angefärbt. Hierfür wurde die Lösung in einer Konzentration von 1 μ M auf die Zellen gegeben, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend das Medium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

Das Anfärben des Endoplasmatischen Retikulums (ER) erfolgte nach dem Protokoll von Thermo Scientific mit dem *ER-Tracker Green*. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 25 nM *ER-Tracker Green* bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium mit frischem Zellkulturmedium ausgetauscht.

Der Färbung der einzelnen Zellorganellen folgte jeweils die visuelle Darstellung mittels Konfokalmikroskopie (siehe 2.5) durch Anregung der Fluorophore in der dazugehörigen Wellenlänge.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde 24 Stunden nach Stimulation beziehungsweise siRNA-Transfektion durchgeführt. Hierbei wurde nach dem Protokoll des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen vorgegangen. Die anschließende Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch.

2.3.2 cDNA-Synthese

Zur Generierung der cDNA wurden maximal 1 µg RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase und Oligo(dT)-Primern nach dem Protokoll des *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits* von Thermo Scientific in einem Ansatz von 20 µl zur Reaktion gebracht.

PCR

RNA-Template	max. 1 µg
<i>Oligo(dT)</i> -Primer	2 µl
<i>5x Reaction Buffer</i>	4 µl
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i> (20 U/µl)	0,5 µl
10 mM dNTP-Mix	2 µl
<i>RevertAid H Minus M-MuLV Reverse</i>	0,25 µl
Transkriptase (10000 U/µl)	
Nuklease-freies Wasser	bis 20 µl

Zur reversen Transkription wurden die oben beschriebenen Reagenzien gemischt und für 60 Minuten bei 42 °C zur Reaktion gebracht. Anschließend führte eine Erhöhung

der Temperatur auf 70 °C für 10 Minuten zur Inaktivierung des Enzyms. Die Aufbewahrung der hergestellten cDNA erfolgte bei 4 °C.

2.3.3 Quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR ist ein Verfahren, das neben der Vervielfältigung eine Quantifizierung der zu untersuchenden DNA ermöglicht. Diese Methode beruht auf einer Fluoreszenzmessung, die während der exponentiellen Phase der PCR in Echtzeit durchgeführt wird und hier proportional zur Menge der entstehenden PCR-Amplifikate ist. Die Erzeugung der Fluoreszenzsignale geht von Sonden aus, welche sequenzspezifisch an die zu untersuchende DNA binden. Diese Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff markiert und an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff. Durch die räumliche Nähe dieser beiden Farbstoffe wird bei Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge ein Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt. Bei der qPCR wird die Elongation des Gegenstranges der zu untersuchenden DNA mithilfe der *Taq*-Polymerase durchgeführt, welche gleichzeitig eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Beim Erreichen der gebundenen Sonde wird diese verdrängt und geschnitten. Dadurch kommt es zu einer räumlichen Entfernung des Reporter-Farbstoffs vom Quencher-Farbstoff und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden.

Die Methode der qPCR wurde zur Bestimmung der relativen Menge einer bestimmten mRNA eingesetzt, welche hierfür in cDNA umgeschrieben wurde (siehe 2.3.2). Als Referenzgen wurde hierbei zeitgleich die Expression der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) gemessen, welche unabhängig von Zellstimulation oder spezifischem *Knock-down* unverändert exprimiert wird.

Die Reaktion der qPCR wurde mit dem *LightCycler* 480 II (Roche) durchgeführt. Alle Messungen wurden nach dem Standard Protokoll von Roche für *mono color hydrolysis probes* mit 45 Amplifikationszyklen durchgeführt. Für spezifische Primer und Sonden siehe Tabelle 2.4.

qPCR

cDNA	6 µl
2x Kappa Probe Fast mastermix	10 µl
forward Primer (100µM)	0,4 µl
reverse Primer (100µM)	0,4 µl
Sonde	0,2 µl
Nuklease-freies Wasser	3 µl

2.3.4 *In vitro* Transkription (IVT)

Die IVT ist ein molekularbiologisches Verfahren zur sequenzspezifischen Synthese von RNA-Molekülen. Hierbei wird ausgehend von einem DNA-Doppelstrang mit passender Promotorsequenz mithilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase ein RNA-Strang *in vitro* synthetisiert. Das kommerzielle System von Ambion (*MEGAShortscript Kit*) macht sich dabei die Eigenschaften der T7-Phagenpolymerase zunutze, da dieses Enzym besonders promotorspezifisch ist. Eine Besonderheit der *in vitro* transkribierten RNA (IVT-RNA) ist die Triphosphatgruppe am 5'-Ende des RNA-Stranges, die beim Einbau des ersten Nukleotids entsteht. Nach abgeschlossener Transkription wird die RNA isoliert. Dafür wird zunächst die verbleibende DNA mithilfe von Desoxyribonukleasen (DNasen) verdaut, welche anschließend mittels Ammoniumacetat inaktiviert werden. Zur Aufreinigung der hergestellten RNA wird diese erst unter Verwendung von Phenol-Chloroform extrahiert und danach mit Ethanol gefällt.

Ausgehend von der gewünschten RNA-Sequenz wurde das DNA-*Template* jeweils als synthetischer *Sense*- und *Antisense*-Strang bestellt (für Sequenzen siehe Tabelle 2.2). Das 3'-Ende dieser DNA-Oligonukleotide beinhaltet zusätzlich die komplementäre Sequenz des T7-Promotors.

Zur Hybridisierung des T7-Promotor-Primers an das einzelsträngige DNA-*Template* wurden diese Moleküle mit einem DNA-Hybridisierungspuffer vermischt und für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt und anschließend mit bei 0,01 °C pro Sekunde bis auf 4 °C heruntergekühlt.

Annealing des T7-Promotor-Primers

DNA-Hybridisierungspuffer	10 µl
T7-Promotor-Primer (100 pmol/ml)	2 µl
DNA- <i>Template</i> (100 pmol/ml)	2 µl

2 Material und Methoden

Die Synthese des zugehörige DNA-Doppelstrang erfolgte mithilfe einer Exo-Minus Klenow DNA-Polymerase, einer DNA-Polymerase ohne Exonukleasefunktion, nach dem Protokoll von Ambion (*MEGAShortscript T7 Kit*).

Synthese des DNA-Doppelstranges

DNA-Template	14 µl
Exo-Minus Klenow DNA-Polymerase (20 U/µl)	2 µl
Puffer-Mix (10x)	2 µl
dNTPs (2,5 mM)	2 µl

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 30 Minuten zur Reaktion gebracht. Zum Denaturieren des Enzyms wurde der Reaktionsansatz für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zur anschließenden Transkription wurde folgender Reaktionsansatz für 12 Stunden bei 37 °C durchgeführt.

In vitro Transkription

DNA-Template	2 µl
Wasser	6 µl
Enzym-Mix	2 µl
dNTPs (75 mM)	8 µl
Puffer-Mix (10x)	2 µl

Zum Verdau der verbleibenden DNA wurde der Ansatz mit 2 µl Turbo-DNase für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieses Enzym wurde anschließend mit 30 µl Ammoniumacetat und 230 µl RNase freiem Wasser inaktiviert. Um die RNA aufzureinigen wurden 300 µl Phenol-Chloroform-Amylalkohol dazu gegeben, für fünf Minuten bei 12000 G zentrifugiert und danach die obere Phenolphase mit 300 µl Chloroform gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Die RNA in der oberen Phase wurde mit 600 µl Ethanol (100%) für zwei Stunden bei minus 20 °C ausgefällt und anschließend nach 30-minütiger Zentrifugation bei 12000 G und 4 °C gewonnen. Das verbleibende RNA-Pellet wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und mit *Mini Quick Spin Columns* (Roche) aufgereinigt. Die Konzentration der hergestellten RNA wurde photometrisch bestimmt.

2.3.5 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine. Hierbei wird zunächst der *Capture*-Antikörper, welcher spezifisch für das nachzuweisende Protein ist, an eine feste Phase gebunden und anschließend mit dem zu untersuchenden Antigen inkubiert. Danach bindet ein zweiter Antikörper, der *Detection*-Antikörper, ein anderes Epitop des Antigens. Dieser zweite Antikörper ist biotinyliert und durch die Zugabe eines Enzymreagenz aus Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase wird ein chromogenes Substrat umgesetzt. Die Intensität dieses Farbumschlags ist proportional zur Konzentration des gesuchten Proteins. Mithilfe einer Standardreihe mit bekannten Konzentrationen können diese Werte quantifiziert werden.

In zellfreien Überständen wurde die Konzentration des Zytokins IP-10 24 oder 48 Stunden nach Stimulation gemessen. Hierfür wurde der humane IP-10 ELISA nach dem Protokoll von *BD Bioscience* durchgeführt.

2.4 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie, im Weiteren auch als *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) -Analyse bezeichnet, können einzelne Zellen einer Probe untersucht werden. Die Analyse der Zellen erfolgt mittels hydrodynamischer Fokussierung in Einzelzellsuspension und anschließender Laserbestrahlung. Der Einsatz verschiedener Laser und Filter erlaubt die Detektion mehrerer, durch Antikörper-Färbungen markierte Oberflächenmoleküle, beziehungsweise die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Moleküle. Das emittierte Signal, das durch die Anregung des Fluoreszenz-Farbstoffs entsteht, ist proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern, beziehungsweise zur Menge an aufgenommenen Molekülen. Gleichzeitig gibt diese Messung Auskunft sowohl über die Größe (Volumen), dies ist im *Forward Scatter* (FSC) dargestellt, als auch über die Komplexität (Granularität, Vesikel), dies ist im *Side Scatter* (SSC) dargestellt, der untersuchten Zellen.

2.4.1 Transfektionskontrolle

Zur Kontrolle der transienten Transfektion wurde eine mit AF 488 markierte RNA (Eurogentec, Sequenz siehe Tabelle 2.1) wie oben beschrieben transfiziert (siehe 2.2.4). Nach Lipofektion wurden die Zellen für vier Stunden inkubiert, nach

Elektroporation wurde keine Inkubationszeit benötigt. Gleichzeitig wurde diese RNA für den identischen Zeitraum zu einer Kontrollbedingung hinzugegeben, jedoch ohne eine Transfektion durchzuführen. Beide Bedingungen, transfiziert und nicht transfiziert, wurden mithilfe der Durchflusszytometrie auf die Intensität des emittierten Signals untersucht und so auf die Aufnahme der RNA geschlossen.

2.4.2 Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) zum Nachweis von Zelltod

Während der Apoptose wird Phosphatidylserin, ein Bestandteil der Zellmembran, von der zytoplasmatischen an die äußere Seite transloziert. Dieses Phospholipid wird von Annexin erkannt, calciumabhängig gebunden und markiert so apoptotische sowie tote Zellen. Um ausschließlich tote Zellen darzustellen wird zusätzlich eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Dieses Molekül ist ein Nukleinsäureinterkalator und markiert Zellen mit perforierten Membranen, während intakte Zellen nicht gefärbt werden können.

Die Zellen wurden zunächst mit 500 µl Annexin-Puffer gewaschen, anschließend in 75 µl Annexin-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten mit 5 µl FITC-markiertem Annexin V-Antikörper auf Eis inkubiert. Danach färbte man die Zellen mit je 1 µl PI (50 µg/ml Stammlösung) für 10 Minuten. Es wurde nach dem Protokoll von *Annexin V Apoptosis Detection Kit* von *BD Bioscience* vorgegangen.

Nach Induktion der Apoptose kann der spezifische Zelltod durch den Anteil der Annexin V positiven Zellen bestimmt werden. Hierfür wird zunächst die Differenz zwischen dem Anteil der Annexin V positiven Zellen der zu untersuchenden Probe und dem Anteil der Annexin V positiven Zellen der Kontrolle gebildet. Dies dividiert man durch die Differenz aus 100 und dem Anteil der Annexin V positiven Zellen der Kontrolle.

$$100 \times \frac{(\text{Annexin V} + (\%) \text{ der Probe}) - (\text{Annexin V} + (\%) \text{ der Kontrolle})}{100 \% - (\text{Annexin V} + (\%) \text{ der Kontrolle})}$$

2.4.3 Mediane und Spezifische Fluoreszenzintensität

Die Mediane Fluoreszenzintensität (*median fluorescence intensity*, MFI) wurde als geometrisches Mittel der einzelnen durchflusszytometrisch untersuchten Proben angegeben. Zur Berechnung der spezifischen Fluoreszenzintensität (*specific fluorescence*

intensity, SFI) wird der MFI-Wert der zu untersuchenden Probe durch den MFI-Wert der Referenzprobe, beispielsweise unbehandelte Zellen, geteilt.

2.5 Konfokale Mikroskopie

Das Konfokalmikroskop ist ein spezielles Lichtmikroskop, das zu jedem Zeitpunkt nur einen Bruchteil des gesamten Präparats beleuchtet und anschließend eine Rekonstruktion des Bildes ermöglicht. Es ist zusätzlich eine Lochblende in der Zwischenbildebene eingebaut, die konfokal zum Beleuchtungspunkt ist. Diese Konfokalität ist gegeben, wenn Lochblende und Beleuchtungspunkt den gleichen Brennpunkt besitzen, wodurch Schnittbilder mit hohem Kontrast erzeugt werden. Außerdem können Fluoreszenz-markierte Präparate mit vier verschiedenen Lasern angeregt werden und das emittierte Licht in unterschiedlichen Wellenlängen detektiert werden.

Zur zusätzlichen Beurteilung der Zellen wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342, einem DNA-Interkalator, für mindestens 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dieser Fluoreszenz-Farbstoff wurde von UV-Licht mit einer Wellenlänge von 350 nm angeregt und emittierte Licht bei 641 nm. Zur Charakterisierung der Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel wurde wie unter 292.2.8 vorgegangen.

2.6 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem gepaarten zweiseitigen *Student's t*-Test. Als signifikant wurde ein p -Wert $< 0,05$ definiert. Die statistische Signifikanz wird angegeben als ns für $p > 0,05$, * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Excel von Microsoft Office durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte der Stimulation von RLR in AML-Zelllinien

3.1.1 5'-Triphosphat-RNA und poly(I:C) induzieren die Hochregulation von RLR

Zur genaueren Beurteilung der RIG-I-vermittelten Antwort in AML-Zellen wurden verschiedene humane AML-Zelllinien mit prototypischen Liganden der RLR transfiziert. Zu diesen Liganden gehören, wie unter 1.2 beschrieben, 5'-Triphosphat-RNA und poly(I:C). Als Kontrolle diente hierbei eine nicht stimulierende OH-RNA. Nach Stimulation mit diesen Molekülen wurde in fünf unterschiedlichen AML-Zelllinien die mRNA-Expression der RLR bestimmt. RIG-I und MDA-5 werden als Interferon-induzierbare Gene nach Aktivierung der RLRs in einem positiven Feedback-loop induziert. Die Hochregulation der RLRs kann daher nach RLR-Stimulation als Marker für einen funktionierenden RIG-I-Signalweg dienen.

Die Transfektion einer mittels IVT (siehe 2.3.4) hergestellten 5'-Triphosphat-RNA führte in allen untersuchten Zelllinien zur Induktion der *RIG-I*-Expression (Abbildung 3.1 A). Nach Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA zeigte sich auch eine Induktion der *MDA5*-mRNA, die jedoch in den Zelllinien OCI-AML3, PL-21 und THP-1 gering ausgeprägt war (Abbildung 3.1 B). Anzumerken ist außerdem, dass in allen Zelllinien das Verhältnis der mRNA-Expression von *RIG-I* zu *MDA5* nach Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA um ein Vielfaches erhöht war (ein Teil der Daten in Abbildung 3.1).

Des Weiteren wurde der Effekt von poly(I:C) auf die RLR-Expression der AML-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich nach Stimulation ebenfalls eine Induktion von *RIG-I* in allen untersuchten AML-Zelllinien (Abbildung 3.1 C). Wie Abbildung 3.1 D zu entnehmen ist, führte die Stimulation mit poly(I:C) ebenfalls zur Induktion der *MDA5*-mRNA, allerdings in einem etwas geringeren Ausmaß verglichen mit der *RIG-I*-Induktion.

Wie unter Abschnitt 1.2 beschreiben, differieren die unterschiedlichen RLR in ihrer Erkennung der Liganden. So stellt kurze doppelsträngige RNA mit einem 5'-Triphosphat den optimalen Liganden für RIG-I dar, während lange doppelsträngige RNA, wie poly(I:C), die MDA5-Stimulation triggert [13-17, 125].

Oben beschriebene Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten AML-Zelllinien *RIG-I* und *MDA5* exprimieren, durch Liganden für MDA5 und RIG-I aktiviert werden können und die Stimulation mit prototypischen Liganden zu einer Hochregulation dieser RLR führt.

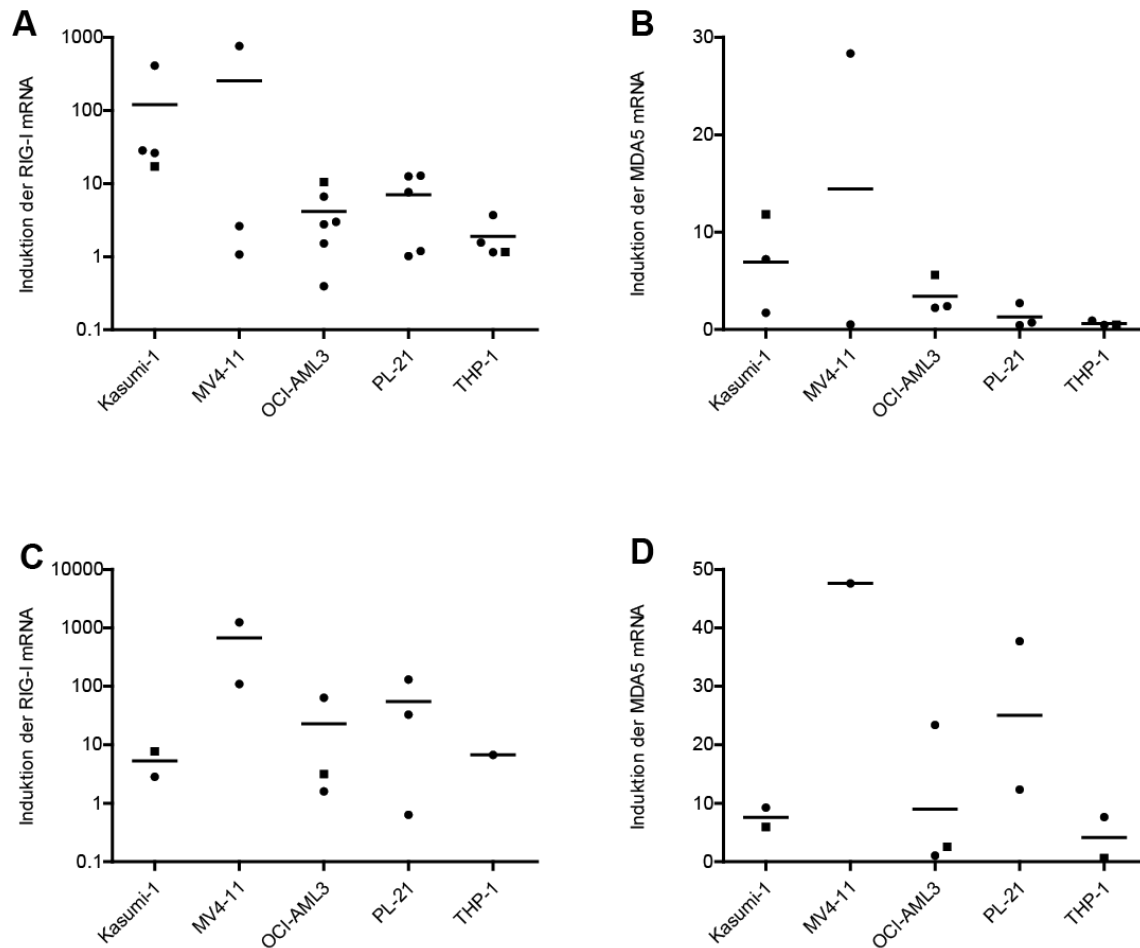


Abbildung 3.1 Stimulation von RIG-I-like Helikasen induziert die Expression von *RIG-I* und *MDA5*. Fünf verschiedene AML-Zelllinien wurden mit ppp-RNA (**A, B**) oder poly(I:C) (**C, D**) mittels Elektroporation (Kreis) oder Lipofektion (Quadrat) transfiziert und 24 h kultiviert. OH-RNA diente jeweils als Kontrolle. Die Transkripte für *RIG-I* (**A, C**) und *MDA5* (**B, D**) wurden mittels qPCR bestimmt. Die Induktion wurde berechnet als Verhältnis der mRNA-Expression nach Stimulation mit ppp-RNA beziehungsweise poly(I:C) zur mRNA-Expression nach Gabe der Kontrolle. Die Linien stellen das arithmetische Mittel dar.

3.1.2 Prototypische Liganden von RLR induzieren Expression und Sekretion des Chemokins IP-10

Die Stimulation von RIG-I löst eine Aktivierung einer Signalkaskade aus, die zur Induktion von Typ-I Interferon und NF- κ B-abhängigen inflammatorischen Zytokinen führt (siehe 1.2). Dies hat wie oben beschrieben eine Reihe von Reaktionen zur Folge. Unter anderem wird das Chemokin IP-10, auch bekannt als *C-X-C motif chemokine 10* (CXCL10), produziert. Hierbei handelt es sich um ein Molekül, welches als Reaktion auf eine Virusinfektion gebildet wird und unter anderem die Migration von T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) steuert [126].

3 Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob der RLR-Signalweg in humanen AML-Zellen intakt ist und aktiviert werden kann, wurde in verschiedene Zelllinien 5'-Triphosphat-RNA transfiziert und anschließend die Produktion von IP-10 gemessen. Als Kontrolle diente jeweils die Transfektion einer nicht-stimulierenden OH-RNA. Die Stimulation von RIG-I mit 5'-Triphosphat-RNA führte in der Zelllinie OCI-AML3 konzentrationsabhängig zu einer ansteigenden Sekretion von IP-10 (Abbildung 3.2 A). Bis zu einer Konzentration von 0,1 ng/μl 5'-Triphosphat-RNA konnte nur eine geringe Induktion des Zytokins nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich ab einer Konzentration von 0,5 ng/μl 5'-Triphosphat-RNA eine deutliche Induktion. Ebenso führte die Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA in allen untersuchten AML-Zelllinien zu einer gesteigerten Expression der *IP-10*-mRNA (Abbildung 3.2 B). Anzumerken ist dabei, dass sowohl die Induzierbarkeit als auch die basale Produktion innerhalb der unterschiedlichen Zelllinien variierte. So konnte besonders für Kasumi-1 und PL-21 nach Stimulation eine gesteigerte Produktion des Zytokins gemessen werden, in THP-1-Zellen hingegen nur eine geringe Induktion. Die basale Expression von *IP-10* variierte stark zwischen den Zelllinien, am höchsten war sie bei Kasumi-1-Zellen ($9,29 \times 10^{-3}$ *IP-10*-mRNA/*HPRT*-mRNA, n=4), am geringsten bei THP-1-Zellen ($1,11 \times 10^{-5}$ *IP-10*-mRNA/*HPRT*-mRNA, n=2).

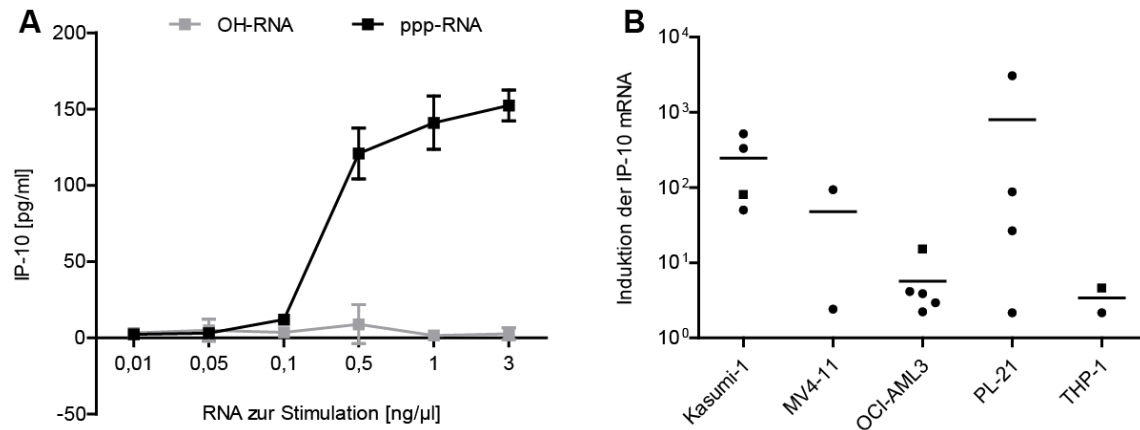


Abbildung 3.2 Stimulation von RLR induziert die Transkription und Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IP-10. (A) OCI-AML3 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentration von ppp-RNA mittels Lipofektion stimuliert, als Vergleich diente jeweils die Transfektion der identischen Menge einer OH-RNA. Nach 48 h wurde der Überstand geerntet und die IP-10-Konzentration im ELISA bestimmt. Dargestellt ist die mittlere IP-10-Konzentration mit Standardabweichung aus einem Versuch mit Duplikaten. (B) Transfektion von ppp-RNA (3 ng/μl) mittels Elektroporation (Kreis) oder Lipofektion (Quadrat) in fünf verschiedene AML-Zelllinien. Nach 24 h wurde die Expression der *IP-10*-mRNA durch qPCR bestimmt. Als Kontrolle diente eine OH-RNA (3 ng/μl). Die Induktion wurde berechnet als Verhältnis der mRNA-Expression nach Stimulation mit poly(I:C) oder 5'-Triphosphat-RNA zur mRNA-Expression nach Gabe der Kontrolle OH-RNA. Die Linien stellen das arithmetische Mittel dar.

3.1.3 Die Stimulation von RLR führt zu reduzierter Zellviabilität

Vorangegangene Experimente bestätigen, dass in AML-Zelllinien RIG-I nach Stimulation hochreguliert wird und darüber hinaus eine Signalkaskade aktiviert wird, die in der Aktivierung von NF-κB- und IRF3/7-Zielgenen resultiert. Wie in Melanomzellen gezeigt werden konnte, führt die RIG-I-Aktivierung unabhängig von Typ-I-Interferon zur Induktion einer proapoptotischen Signalkaskade [36]. Um diesen Effekt in AML-Zellen zu analysieren, wurden verschiedene Zelllinien nach RIG-I-Stimulation auf Apoptoseinduktion und auf Zellviabilität untersucht.

Nach der Stimulation der RLR wurde im *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* die metabolische Aktivität der Zellen mit Hilfe der Verstoffwechselung eines Indikatorfarbstoffes ermittelt. Hierbei konnte sowohl nach Transfektion von 5'-Triphosphat-RNA (Abbildung 3.3 A), als auch von poly(I:C) (Abbildung 3.3 B) in den meisten der untersuchten AML-Zelllinien eine reduzierte Zellviabilität beobachtet werden. So zeigte beispielsweise die Zelllinie OCI-AML3 nach Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA eine signifikante Reduktion der Viabilität und nach Stimulation mit poly(I:C) im Mittel eine ausgeprägte, jedoch inkonstante, Reduktion der Viabilität. Demgegenüber führte die Stimulation der Zelllinie THP-1 zu nahezu keiner Reduktion der Viabilität. Dies ist indes übereinstimmend

3 Ergebnisse

mit einer vergleichsweise geringen Induktion sowohl der RLR-Expression (siehe 3.1.1) und der *IP-10*-Expression (siehe 3.1.2) als auch der Apoptoseinduktion (siehe 3.1.3) bei dieser Zelllinie. Auffallend ist ebenfalls an dieser Stelle, dass in MV4-11-Zellen die Aktivierung von RIG-I durch 5'-Triphosphat-RNA nahezu keine Auswirkung auf die Zellviabilität zeigte, während die Stimulation durch poly(I:C) zu einer deutlichen Reduktion der Viabilität führte.

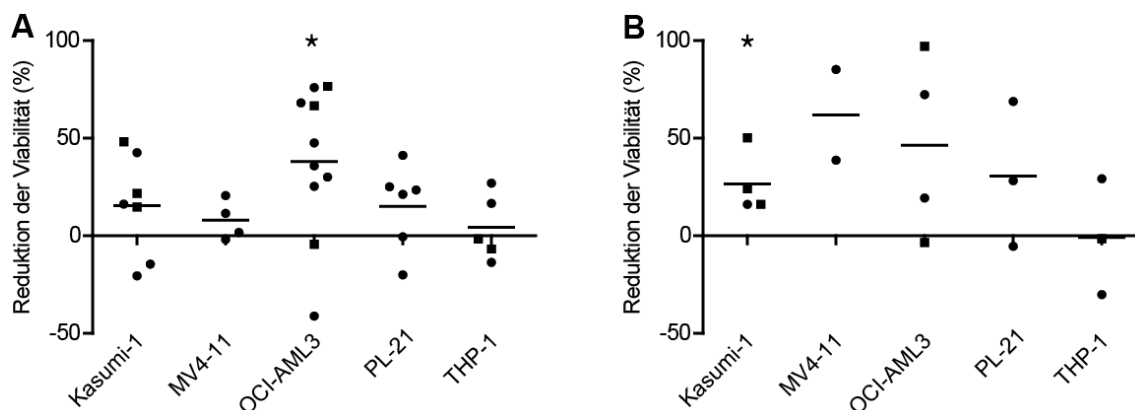


Abbildung 3.3 Transfektion von 5'-Triphosphat-RNA oder poly(I:C) reduziert die Viabilität von AML-Zelllinien. Transfektion von ppp-RNA (A) oder poly(I:C) (B) mittels Elektroporation (Kreis) oder Lipofektion (Quadrat) in fünf verschiedene AML-Zelllinien. Als Kontrolle diente die Transfektion von OH-RNA. Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde die Differenz zwischen der Viabilität nach Stimulation und der Viabilität der Kontrolle ermittelt und daraus die Signifikanz berechnet. Die Linien stellen das arithmetische Mittel dar.

Darüber hinaus wurde die Zellviabilität mit einem zweiten Auswertesystem, der Durchflusszytometrie bestimmt und dabei untersucht, welcher Anteil des Zelltodes über Apoptose vermittelt wurde. Nach RLR-Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA und poly(I:C) erfolgte mithilfe einer Annexin V-Färbung eine durchflusszytometrische Analyse auf das proapoptotische Oberflächenmolekül Phosphatidylserin. Zugleich wurden tote Zellen durch die Markierung von PI dargestellt. Dabei zeigte sich durch die Aktivierung der RLR ein gesteigertes Signal und damit eine Hoch-Regulation von Annexin V und PI, was in Abbildung 3.4 exemplarisch für OCI-AML3 dargestellt ist.

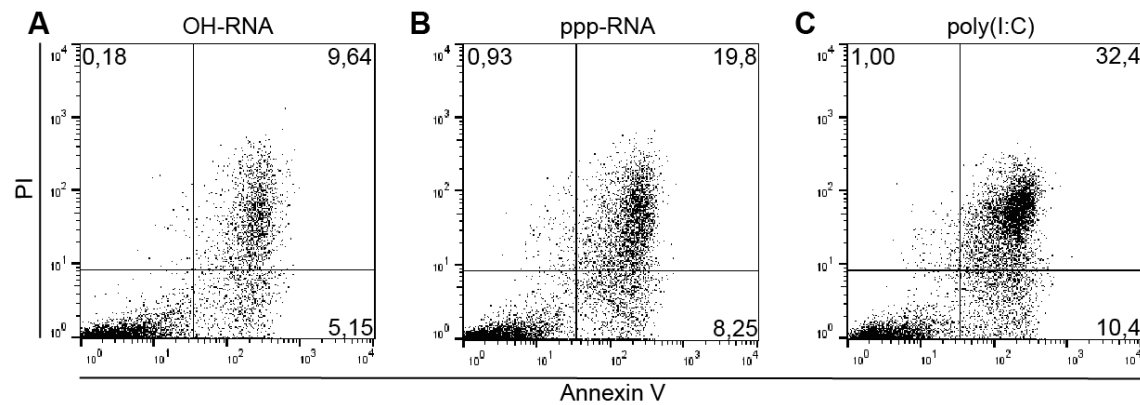


Abbildung 3.4 Apoptoseinduktion in der AML-Zelllinie OCI-AML3 durch 5'-Triphosphat-RNA oder poly(I:C). Transfektion von OH-RNA (A), ppp-RNA (B) oder poly(I:C) (C) mittels Lipofektion in die AML-Zelllinie OCI-AML3. Nach 24 h Kultivierung wurden apoptotische Zellen mit Annexin V und tote Zellen mit Propidiumiodid (PI) markiert und deren Anteil im Durchflusszytometer bestimmt.

Auch die Berechnung des Apoptose-spezifische Zelltodes aus dem Anteil der Annexin V positiven Zellen (siehe 2.4.2) zeigte für manche Zelllinien eine Apoptoseinduktion (Tabelle 3.1). Ein deutlicher Anstieg des Apoptose-spezifischen Zelltodes war sowohl nach Stimulation mit poly(I:C) bei den Zelllinien MV4-11, OCI-AML3 und PL-21 als auch nach Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA bei OCI-AML3 zu beobachten. Die Zelllinien Kasumi-1 und THP-1 wiesen vergleichsweise geringe Effekte bezüglich der Apoptoseinduktion auf.

Tabelle 3.1 Zelltodinduktion in AML-Zelllinien

Stimulation ^a	Zelllinie	spezifischer Zelltod (%) ^b
ppp-RNA		
	Kasumi-1	1,8
	MV4-11	0,5
	OCI-AML3	15,6
	PL-21	-6,1
	THP-1	5,2
poly(I:C)		
	Kasumi-1	4,3
	MV4-11	19,9
	OCI-AML3	32,9
	PL-21	13,0
	THP-1	7,9

^a Elektroporation mit ppp-RNA (3000 ng/μl), poly(I:C) (1000 ng/μl) oder OH-RNA (3000 ng/μl) als Kontrolle. ^b Nach 24 h wurden apoptotische Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer bestimmt und der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben.

Dieses zweite Auswertesystem bestätigt im Prinzip die Beobachtungen des *CellTiter-Blue Cell Viability Assays* (siehe Abbildung 3.3), auch wenn die durchflusszytometrische Messung in allen fünf Zelllinien jeweils nur einmal durchgeführt wurde.

Zusammenfassend zeigen die oben beschriebenen Daten, dass die untersuchten AML-Zelllinien funktionell intakte RLR exprimieren.

3.2 Target-spezifische siRNAs reduzieren die Viabilität von AML-Zelllinien

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob in AML-Zelllinien durch einen spezifischen *Knock-Down* von ausgewählten Genen Apoptose induziert und die Viabilität vermindert werden kann. Als Zielgene wurden *bromodomain-containing 4 (BRD4)*, *FLT3*, *acute myeloid leukemia 1 eight-twenty-one (AML1-ETO)*, *Polo-like kinase 1 (PLK1)*, *Wilms-Tumor-Proteins 1 (WT1)*, *Myeloid Cell Leukemia 1 (MCL1)*, *caudal type homeobox 2 (CDX2)* und *NPM1* ausgewählt. Die Rationale für die Auswahl dieser Zielgene wird im Folgenden bei jedem Gen kurz ausgeführt.

3.2.1 BRD4

BRD4 ist ein Protein der BET Familie, welches die Transkription beeinflusst indem es Histone azetyliert und so eine essentielle Rolle in Zellwachstum und Zellzykluskontrolle spielt. Vorarbeiten anderer Gruppen zeigten anhand eines *in vivo* Mausmodells, dass BRD4 essenziell für Wachstum, Progression und Differenzierung in AML ist [127]. Zunächst erfolgte die Analyse der Effektivität des *Knock-downs* von zwei verschiedenen *BRD4*-spezifischen siRNAs (siBRD4_1880 und siBRD4_2442) mittels qPCR. Als Negativkontrolle diente ein in Länge und in chemischen Eigenschaften vergleichbares RNA-Molekül (ctrl-siRNA), welches eine zufällige, in humanen Zellen nicht vorhandene Sequenz enthält. Das Expressionsniveau nach *Knock-down* ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Hierbei fällt auf, dass die siRNA siBRD4_1880 im Allgemeinen einen besseren *Knock-down* erzielen konnte als die siRNA siBRD4_2442.

Um die funktionelle Wirkung des erreichten *Knock-downs* zu analysieren, wurden apoptotische Zellen mittels Annexin V-Bindung durchflusszytometrisch bestimmt, daraus der spezifische Zelltod berechnet (siehe 2.4.2) und in Tabelle 3.2 dargestellt. Hierbei konnte vor allem bei OCI-AML3-Zellen eine Apoptoseinduktion als Folge der Behandlung mit der BRD4-spezifischen siRNA beobachtet werden. Außerdem fiel ein

geringer Anstieg des spezifischen Zelltodes nach *Knock-down* mit siBRD4_1880 in Kasumi-1 auf. Die anderen untersuchten Zelllinien zeigten diesbezüglich keine Effekte. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung der Viabilität zwei oder drei Tage nach *Knock-down* mittels *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* (siehe 2.2.6). Wie Tabelle 3.1 zeigt, führte die siRNA siBRD4_1880 zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität in den Zelllinien Kasumi-1 und OCI-AML3. Ebenso resultierte dieser *Knock-down* in OCI-AML3-Zellen in einer signifikanten Reduktion der Viabilität über einen Zeitraum von fünf Tagen (Abbildung 3.5 A). Auch der *Knock-down* durch siBRD4_2442 induziert in diesen beiden Zelllinien eine deutliche Reduktion der Viabilität. Trotz eines vergleichbaren Expressionsniveaus nach *Knock-down* durch BRD4_2442 konnte in den anderen untersuchten Zelllinien keine Verminderung der Viabilität beobachtet werden. Auffallend ist an dieser Stelle, dass die teilweise ausgeprägte Reduktion der Viabilität nicht einhergeht mit einer ähnlich markanten Reduktion des spezifischen Zelltodes. Die Analyse des spezifischen Zelltodes beruht auf der Expression von Phosphatidylserin, einem Molekül, welches im extrazellulären Monolayer der Zellmembran zu finden ist, sobald diese Zelle in Apoptose geht. Die Analyse der Zellviabilität wiederum beruht auf dem metabolischen Umsatz dieser Zellen. Wie in Tabelle 3.2 erkenntlich, führt der *Knock-down* von BRD4 teilweise zu einer deutlichen Reduktion der Viabilität, jedoch nur zu einer geringen Induktion der Apoptose. Dieser Beobachtung können mehrere Ursachen zu Grunde liegen. Zum einen kann der *Knock-down* von BRD4 lediglich eine Verminderung der metabolischen Aktivität beziehungsweise ein verringertes Zellwachstum zur Folge haben und sich nicht auf den Zelltod an sich auswirken. Eine verminderte Proliferation durch BRD4-Inhibitoren konnte bereits bei einigen AML-Zelllinien gezeigt werden [127]. Zum anderen könnte durch die Repression von BRD4 neben der Apoptose auch eine andere Art des Zelltodes induziert werden, wie beispielsweise die sogenannte mitotische Katastrophe, welche durch BRD4 Inhibition in Brustkrebszellen ausgelöst werden konnte [128].

3 Ergebnisse

Tabelle 3.2 Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität in AML-Zellen durch *BRD4*-Knock-down

Zelllinie	Expressionsniveau ^b			spezifischer Zelltod ^c			Reduktion der Viabilität ^d			
	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	p-Wert
siBRD4_1880^a										
Kasumi-1	14,4	3,4	5	4,5	1,7	2	21,0	5,6	5	0,02
MV4-11	24,0	5,9	3	0,8	0,0	2	2,9	7,8	3	0,75
OCI-AML3	21,9	4,1	7	3,9	1,7	2	34,5	8,7	7	5x10 ⁻³
PL-21	16,8	2,7	6	-1,5	1,5	2	1,3	5,4	6	0,77
THP-1	12,0	2,9	5	-0,2	1,5	2	-0,6	12,8	5	0,97
siBRD4_2442^a										
Kasumi-1	17,4	4,4	3	0,8	2,5	2	17,5	8,5	3	0,18
MV4-11	55,3	10,0	2	1,5	0,1	2	-1,6	7,5	2	0,87
OCI-AML3	14,7	0,2	2	18,3	8,3	2	23,3	9,4	2	0,24
PL-21	24,3	6,7	2	-2,5	2,0	2	-4,7	23,5	2	0,87
THP-1	24,3	1,8	3	0,2	0,4	2	-3,3	17,3	3	0,86

^a Transfektion mittels Elektroporation. Als Referenz diente die Transfektion einer Kontroll-siRNA. ^b Bestimmung der mRNA mittels qPCR nach 24 h, prozentual im Vergleich zur ctrl-siRNA. ^c Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer nach 24 h. Der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben. ^d Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde das Verhältnis der Viabilität nach Stimulation zur Viabilität der ctrl-siRNA berechnet.

3.2.2 FLT3

Ein weiteres mögliches Target der siRNA in AML ist FLT3. Hierbei handelt es sich um einen Zytokinrezeptor, welcher in multipotenten hämatopoetischen Stammzellen und Blasten exprimiert wird und eine entscheidende Rolle bei Differenzierung und Proliferation spielt. Interne Tandem Duplikationen (ITD) oder Punktmutationen in diesem Gen gehören zu den häufigsten Mutationen in AML (siehe Tabelle 1.1) und gehen mit einer schlechteren Prognose einher [129-131]. Diese Mutationen können zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor führen, welcher einen permanenter Proliferationsstimulus darstellt.

Von den hier untersuchten AML-Zelllinien tragen MV4-11 und PL-21 eine FLT3-ITD. Während MV4-11 zwei mutierte Allele aufweist, exprimiert PL-21 ein mutiertes und ein Wildtyp-Allel [132]. Als *FLT3*-spezifische siRNAs wurden zwei siRNAs (siFLT3_1313 und siFLT3_2301) gewählt, welche alle *FLT3*-Varianten abdecken, sowie eine mutationsspezifische siRNA, welche ihre Bindungsstelle in der mutierten Stelle der *FLT3*-mRNA der Zelllinie MV4-11 besitzt (siFLT3_mut). Nach Transfektion der entsprechenden siRNAs erfolgte der Nachweis der mRNA mittels qPCR. Als Vergleich diente die

oben beschriebenen Kontroll-siRNA. Allerdings stellte sich der Nachweis der mRNA mittels qPCR meist schwierig dar. Es wurden mehrere Primerpaare getestet, doch keines zeigte ein befriedigendes Ergebnis, sodass das Ergebnis der qPCR teilweise verworfen werden musste. Daher gestaltet sich eine eindeutige Aussage über den erzielten *Knock-down* als schwierig. Wie Tabelle 3.3 zeigt, war zu beobachten, dass das Expressionsniveau nach Transfektion von siFLT3_1313 am geringsten bei Kasumi-1 war und auch die Zelllinien OCI-AML, PL-21 und THP-1 wiesen eine verminderte Expression auf. Allerdings konnte in der Zelllinie MV4-11 mit keiner der untersuchten siRNAs ein ausreichender *Knock-down* nachgewiesen werden. Fraglich blieb jedoch, ob es sich um einen unzureichenden *Knock-down* oder um einen unzureichenden Nachweis von FLT3 in der qPCR handelt.

Der spezifische Zelltod und der Einfluss auf das Überleben nach *FLT3-Knock-down* wurde analog zu BRD4 bestimmt (siehe oben) und in Tabelle 3.3 dargestellt. Hierbei zeigte sich bei beiden siRNAs eine ausgeprägte Apoptoseinduktion bei Kasumi-1 und OCI-AML3, sowie eine geringe Induktion bei MV4-11. Die Zelllinien PL-21 und THP-1 wiesen nahezu keine Veränderungen bezüglich der Apoptose auf. Die Transfektion der *FLT3*-spezifischen siRNAs resultierte in den Zelllinien Kasumi-1, MV4-11, OCI-AML3 und PL-21 in einer verminderten Viabilität, insbesondere bei MV4-11, während THP-1-Zellen nahezu keine Veränderungen zeigten. Auch konnte über einen Zeitraum von fünf Tagen eine verminderte Viabilität gemessen werden, hier in Abbildung 3.5 B exemplarisch für die Zelllinie OCI-AML3 dargestellt. Die mutationsspezifische siRNA siFLT3_mut resultierte nach Transfektion in MV4-11-Zellen zwar in einer verminderten Viabilität und einer geringen Apoptoseinduktion, allerdings war dieser Effekt in dieser Zelllinie schwächer ausgeprägt als nach Transfektion der anderen zwei siRNAs. Auffallend war außerdem, dass sich bei MV4-11 und PL-21, verglichen mit den nicht-mutierten Zelllinien Kasumi-1 und OCI-AML3, trotz FLT3-ITD ein ähnlicher Effekt der siRNAs auf Reduktion der Zellviabilität zeigte.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3 Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität in AML-Zellen durch *FLT3*-Knock-down.

Zelllinie	Expressionsniveau ^b			spezifischer Zelltod ^c			Reduktion der Viabilität ^d			
	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	p-Wert
siFLT3_1313 ^a										
Kasumi-1	22,9	1,4	2	13,5	12,2	3	21,6	13,5	6	0,17
MV4-11	103,3	8,7	4	4,9	1,8	3	24,0	3,1	5	1x10 ⁻³
OCI-AML3	42,0	7,5	5	11,3	7,7	2	15,2	12,4	5	0,29
PL-21	36,5	9,0	4	-0,1	1,7	3	10,7	4,1	5	0,06
THP-1	42,5	8,3	2	2,4	1,6	2	2,9	11,7	5	0,82
siFLT3_2301 ^a										
Kasumi-1				14,7	10,3	3	18,0	12,0	4	0,23
MV4-11	88,3	12,7	2	6,9	1,0	3	32,9	4,6	3	0,02
OCI-AML3	31,1	7,0	2	12,9	7,3	2	7,1	17,2	3	0,72
PL-21	63,9		1	3,4	3,2	3	17,5	0,3	3	2x10 ⁻⁴
THP-1				-0,8	0,8	2	2,3	12,3	3	0,87
siFLT3_mut ^a										
MV4-11	86,0	11,1	2	2,5	0,5	2	16,3	15,6	3	0,41

^a Transfektion mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer Kontroll-siRNA. ^b Bestimmung der mRNA mittels qPCR nach 24 h, prozentual im Vergleich zur ctrl-siRNA. ^c Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer nach 24 h. Der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben. ^d Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde das Verhältnis der Viabilität nach Stimulation zur Viabilität der Kontrolle berechnet.

3.2.3 AML1-ETO

Ein weiteres mögliches Zielgen in AML-Zellen für eine therapeutische siRNA ist *AML1-ETO*, auch bekannt als *RUNX1-RUNX1T1*. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsgen aus dem *AML1*- und dem *ETO*-Gen, welches durch eine balancierte Translokation t(8;21) entsteht und sich in einem Teil der Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämien findet (siehe Tabelle 1.1) [133-135]. *AML1* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung in hämatopoetischen Stammzellen reguliert. *ETO* gehört zur Gruppe der transkriptionellen Regulatoren, welche über Rekrutierung von Corepressoren am Chromatin-Remodelling beteiligt ist. Das Fusionsgen *AML1-ETO* kann ebenso wie *AML1* als transkriptioneller Aktivator fungieren und so die Differenzierung blockieren sowie die Selbsterneuerung fördern [136].

Von den hier untersuchten Zelllinien trägt Kasumi-1 eine *AML1-ETO*-Mutation. Zur Analyse des spezifischen *Knock-downs* dieses Gens wurden zwei verschiedene siRNAs gegen *AML1-ETO* (siAML1-ETO_7+12 und siAML1-ETO_14+5) transfiziert. Die anschließende Kontrolle der *Knock-down*-Effizienz wurde mittels qPCR

durchgeführt und als Expressionsniveau in Tabelle 3.4 dargestellt. Allerdings gestaltete sich der Nachweis dieser mRNA schwierig, sodass trotz mehrmaliger Wiederholungen die qPCR in einigen Fällen keine Ergebnisse lieferte. Auch war der Nachweis der *Knock-down*-Effizienz großen Schwankungen unterworfen und es konnte teilweise eine gesteigerte Expression der *AML1-ETO*-mRNA nach Transfektion der siRNA beobachtet werden. Fraglich bleibt deshalb auch hier, ob es sich um einen unzureichenden *Knock-down* oder um einen unzureichenden Nachweis handelt. Da die Zelllinie MV4-11 keine *AML1-ETO*-Mutation besitzt, ist hier auch kein Nachweis in der qPCR zu erwarten.

Während eine Induktion der Apoptose in Kasumi-1 nur mit der siRNA siAML1-ETO_7+12 beobachtet werden konnte, kam es mit beiden untersuchten siRNAs zu einer deutlichen Reduktion der Viabilität (Tabelle 3.4). Ebenso führten beide siRNAs über eine Zeitspanne von sieben Tagen zu einer signifikant reduzierten Viabilität der Kasumi-1-Zellen (Abbildung 3.5 C). In der Kontroll-Zelllinie MV4-11 konnte weder eine Apoptoseinduktion noch eine Reduktion der Viabilität beobachtet werden.

Die beobachtete deutliche Reduktion der Viabilität durch Transfektion der *AML1-ETO*-spezifischen siRNAs in Kasumi-1, nicht jedoch in MV4-11, kann als Indiz dafür gewertet werden, dass zwar ein *Knock-down* stattgefunden hat, dieser teilweise jedoch nicht in der qPCR nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 3.4 Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität in AML-Zellen durch *AML1-ETO*-*Knock-down*.

Zelllinie ^a	Expressionsniveau ^c			spezifischer Zelltod ^d			Reduktion der Viabilität ^e			
	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	p-Wert
siAML1-ETO_7+12^b										
Kasumi-1	171,7	107,4	2	11,9	5,3	3	34,7	10,4	4	0,04
MV4-11				1,7	0,1	2	-1,0	4,2	2	0,85
siAML1-ETO_14+5^b										
Kasumi-1	79,5	36,2	2	0,0	3,8	2	16,9	6,3	3	0,12
MV4-11				1,2	0,8	2	-8,0	1,7	2	0,14

^a Die Zelllinie Kasumi-1 trägt eine *AML1-ETO* Mutation, die MV4-11 jedoch nicht. ^b Transfektion mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer Kontroll-siRNA. ^c Bestimmung der mRNA mittels qPCR nach 24 h, prozentual im Vergleich zur ctrl-siRNA. ^d Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer nach 24 h. Der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben. ^e Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde das Verhältnis der Viabilität nach Stimulation zur Viabilität der ctrl-siRNA berechnet.

3 Ergebnisse

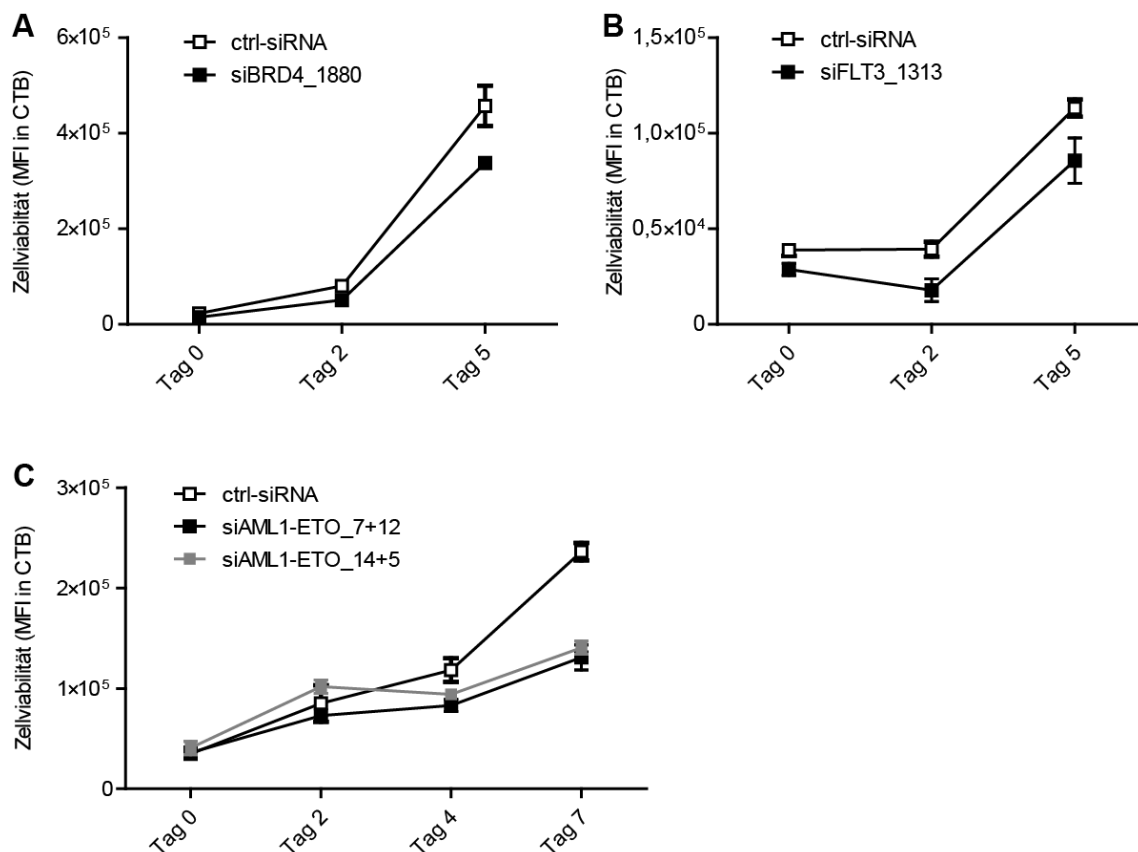


Abbildung 3.5 Transfektion von Target-spezifischen siRNAs reduziert die Viabilität von AML-Zelllinien. Transfektion von siBRD4_1880 (A), siFLT3_1313 (B), siAML1-ETO_7+12 (C) oder siAML1-ETO_14+5 (C) mittels Elektroporation in die AML-Zelllinie OCI-AML3 (A, B) oder Kasumi-1 (C). Als Kontrolle diente jeweils die Transfektion einer Kontroll-siRNA. Die Messung der Viabilität erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten mittels *CellTiter-Blue* Assay. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus einem repräsentativen Versuch mit technischen Triplikaten aus insgesamt 7 (A), 6 (B) oder 4 (C) Versuchen.

3.2.4 PLK1

Von Interesse für die Tumorthherapie bei der AML ist ebenfalls die Kinase PLK1. Dabei handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase, die eine entscheidende Rolle während der Mitose spielt [137]. Wie andere Gruppen zeigen konnten, ist PLK1 in AML überexprimiert [138] und seine Inhibition führt in Blasten von AML-Patienten zum Arrest der Mitose und zum Zelltod [139].

Um die Effekte eines *Knock-downs* dieses Gens zu untersuchen, wurden zwei verschiedene siRNAs (siPLK1_1069 oder siPLK1_1424) in fünf unterschiedliche AML-Zelllinien transfiziert. Das Expressionsniveau nach *Knock-down* wurde mittels qPCR bestimmt (Tabelle 3.5). Während die Transfektion der siRNA siPLK1_1069 meist zu keinem zufriedenstellenden *Knock-down* führte, konnte mithilfe der anderen siRNA

das *PLK1*-Expressionsniveau in allen Zelllinien auf ein ähnlich niedriges Niveau reduziert werden.

Der spezifische Zelltod und die Viabilität wurden analog zu den oben beschriebenen Targets bestimmt und sind in Tabelle 3.5 dargestellt. Eine Apoptoseinduktion konnte bei beiden siRNAs beobachtet werden, am deutlichsten jedoch in der Zelllinie OCI-AML3. Vergleichbar mit dieser Beobachtung war ebenso die Messung der Viabilität, sodass bei allen Bedingungen eine reduzierte metabolische Aktivität nachzuweisen war, dies auch am deutlichsten in OCI-AML3-Zellen. Auffällig war an dieser Stelle, dass in MV4-11-Zellen die Transfektion der siRNA siPLK1_1424 zu einer ausgeprägten Reduktion der Viabilität führte, die andere siRNA jedoch nur geringe Effekte zeigten. Bei siPLK1_1069 kann dies, im Gegensatz zu siPLK1_1424, durch eine geringe *Knock-down*-Effizienz erklärt werden.

Tabelle 3.5 Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität in AML-Zellen durch *PLK1*-Knock-down.

Zelllinie	Expressionsniveau ^b			spezifischer Zelltod ^c			Reduktion der Viabilität ^d			
	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	p-Wert
siPLK1_1069^a										
Kasumi-1	40,2	20,8	3	7,1	4,6	3	37,4	17,2	3	0,16
MV4-11	75,3	6,6	2	2,9	0,3	2	8,9	6,6	2	0,41
OCI-AML3	51,5	8,4	2	21,2	10,4	2	44,0	6,5	2	0,09
PL-21	64,4	6,0	2	9,2	8,1	2	18,8	2,6	2	0,09
THP-1	140,0	90,1	3	5,6	4,3	3	11,1	14,5	3	0,53
siPLK1_1424^a										
Kasumi-1	20,8	10,8	7	14,9	5,0	5	55,7	8,7	7	7x10 ⁻⁴
MV4-11	33,7	7,1	7	10,1	4,0	6	28,9	9,9	7	0,03
OCI-AML3	36,3	5,5	8	31,4	7,6	6	72,4	5,9	8	6x10 ⁻⁶
PL-21	31,0	7,8	7	5,3	1,1	6	46,9	8,7	7	2x10 ⁻³
THP-1	20,5	13,1	9	16,9	2,7	7	50,5	8,8	9	4x10 ⁻⁴

^a Transfektion mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer Kontroll-siRNA. ^b Bestimmung der mRNA mittels qPCR nach 24 h, prozentual im Vergleich zur ctrl-siRNA. ^c Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer nach 24 h. Der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben. ^d Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde das Verhältnis der Viabilität nach Stimulation zur Viabilität der ctrl-siRNA berechnet.

3.2.5 WT1

Ein weiteres mögliches Zielgen für siRNAs in AML ist das Gen WT1. Dabei handelt es sich um einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der essentiell für Zelldifferenzierung und

Zellwachstum ist [140]. In AML ist sowohl eine Überexpression von *WT1* [141-143] als auch das Auftreten von Mutationen [144] beschrieben. Beides korreliert klinisch mit einer höheren Rückfallquote und einem schlechteren Gesamtüberleben [145-147]. Arbeiten anderer Gruppen konnten zeigen, dass die Inhibition der *WT1*-Expression in Myeloischer Leukämie zur Apoptoseinduktion und zu einem verminderten Leukämiewachstum führt [148-150].

Um die Auswirkungen eines *Knock-downs* dieses Gens zu untersuchen, wurden zwei verschiedene siRNA (siWT1_628 oder siWT1_1424) in fünf unterschiedliche AML-Zelllinien transfiziert. Das Expressionsniveau nach *Knock-down* wurde mittels qPCR bestimmt und in Tabelle 3.6 dargestellt. Die siRNA siWT1_628 führte lediglich in der Zelllinie THP-1 zu einem feststellbaren *Knock-down*, in den anderen vier Zelllinien konnte dieser nicht erzielt werden. Hingegen führte die Transfektion der siRNA siWT1_1424 in allen untersuchten Zelllinien zu einer Reduktion der *WT1*-Expression, allerdings auch hier teilweise nur in geringem Ausmaß.

Nach Transfektion der *WT1*-spezifischen siRNAs wurde analog zu den oben beschriebenen Targets der spezifische Zelltod und die Viabilität gemessen (Tabelle 3.6). Trotz unzureichendem *Knock-down* konnte sowohl eine Apoptoseinduktion als auch eine Reduktion der Viabilität nachgewiesen werden. Während sich bei den Zelllinien MV4-11 und OCI-AML3 ein deutlicher Effekt zeigte, führte der *Knock-down* in Kasumi-1, PL-21 und THP-1 nur zu einer geringen bis gar keiner Apoptoseinduktion beziehungsweise Reduktion der Viabilität.

Da der *Knock-down* in der qPCR in beiden Ansätzen nicht mit der Induktion von Zelltod korreliert, bleibt fraglich, ob es sich bei den beobachteten Effekten um Auswirkungen eines *WT1*-spezifischen *Knock-downs* oder um *Off-target*-Effekte handelt.

Tabelle 3.6 Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität in AML-Zellen durch *WT1*-Knock-down.

Zelllinie	Expressionsniveau ^b			spezifischer Zelltod ^c			Reduktion der Viabilität ^d			
	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	p-Wert
siWT1_628^a										
Kasumi-1	90,2	21,5	2	-0,6	2,4	2	11,6	5,5	2	0,28
MV4-11	99,2	6,1	3	16,4	13,4	3	33,5	20,1	3	0,24
OCI-AML3	89,4	0,7	2	24,1	12,0	2	25,0	12,4	2	0,29
PL-21	147,8	30,6	3	0,8	1,9	2	13,9	13,0	3	0,39
THP-1	37,4	4,4	3	2,3	1,3	3	4,4	5,3	3	0,49
siWT1_1424^a										
Kasumi-1	53,0	17,3	3	2,4	2,7	2	11,2	8,3	3	0,31
MV4-11	77,2	11,6	4	19,0	15,2	3	25,4	16,9	4	0,23
OCI-AML3	58,9	2,2	3	26,4	16,8	2	21,2	9,8	3	0,16
PL-21	87,9	20,5	4	1,8	3,1	2	-3,4	17,4	4	0,86
THP-1	48,1	8,3	4	5,9	4,2	3	9,3	10,3	4	0,43

^a Transfektion mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer Kontroll-siRNA. ^b Bestimmung der mRNA mittels qPCR nach 24 h, prozentual im Vergleich zur ctrl-siRNA. ^c Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer nach 24 h. Der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben. ^d Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde das Verhältnis der Viabilität nach Stimulation zur Viabilität der ctrl-siRNA berechnet.

3.2.6 MCL1

Das *MCL1*-Gen kodiert für ein Protein der BCL2-Familie, welches bei der Regulation der Apoptose von Bedeutung ist [151]. MCL1 ist essentiell für die embryonale Entwicklung [152] und für das Überleben unterschiedlicher Zellen, wie hämatopoetischer Stammzellen [153], Lymphozyten [154], neutrophiler Granulozyten [155] oder Neurone [156]. Darüber hinaus ist *MCL1* in verschiedenen Tumoren verstärkt exprimiert [157]. Arbeiten anderer Gruppen konnten zeigen, dass dieses Protein sowohl essentiell zur Entwicklung und zum Überleben der AML-Zellen ist [158], als auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Medikamenten spielt [159]. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von MCL-1 in AML zur Resistenzentwicklung gegenüber Standardtherapien beiträgt [160, 161].

Um die Auswirkungen eines *Knock-downs* dieser RNA zu untersuchen, wurden drei verschiedene *MCL1*-spezifische siRNAs (siMCL1_670, siMCL1_735 oder siMCL1_3989) in fünf unterschiedliche AML-Zelllinien transfiziert. Die Expression der *MCL1*-mRNA wurde mittels qPCR bestimmt und mit der *MCL1*-Expression nach Transfektion einer Kontroll-siRNA verglichen (Tabelle 3.7). Außerdem wurde analog

3 Ergebnisse

zu den oben beschriebenen Targets der spezifische Zelltod und die Viabilität bestimmt (Tabelle 3.7).

Ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Zellen konnte in OCI-AML3-Zellen durch die siRNAs siMCL1_670 und siMCL1_735 beobachtet werden. Während siMCL1_735 ebenfalls in MV4-11 und PL-21 zu einer Induktion des spezifischen Zelltods führte, zeigte sich in den anderen Bedingungen nur eine marginale Apoptoseinduktion.

Eine Reduktion der Viabilität war am deutlichsten in OCI-AML3-Zellen nach Transfektion von siMCL1_735, sowie in THP-1-Zellen nach Transfektion von siMCL1_3989 zu beobachten. Aber auch andere Bedingungen zeigten teilweise eine ausgeprägte Verminderung der Viabilität.

In der qPCR-Auswertung wurden zwei divergierende Primerpaare verwendet (qPCR1 und qPCR2), da ein *Knock-down* trotz zu beobachtender Effekte auf Viabilität und Apoptose nicht nachweisbar war. Damit wurde der Frage nachgegangen werden, ob diese Diskrepanz auf einen fehlenden Nachweis des *MCL1*-spezifischen *Knock-downs* oder auf *Off-target*-Effekte zurückzuführen sei. Es zeigte sich mit keinem der beiden Primerpaare eine zufriedenstellende Effizienz des *Knock-downs*, lediglich die siRNA siMCL1_3989 konnte die *MCL1*-Expression teilweise reduzieren, sodass in diesem Fall von *Off-target*-Effekten ausgegangen werden muss.

Tabelle 3.7 Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität in AML-Zellen durch *MCL1-Knock-down*.

Zelllinie	Expressionsniveau (qPCR1) ^b			Expressionsniveau (qPCR2) ^b			spezifischer Zelltod ^c			Reduktion der Viabilität ^d			
	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	p-Wert
siMCL1_670^a													
Kasumi-1	104,3	12,4	3	101,7	17,0	3	4,2	2,8	2	9,9	7,6	4	0,28
MV4-11	95,5		1	295,2	157,8	2	2,9	1,1	2	4,5	0,1	2	0,02
OCI-AML3	153,7	44,6	5	121,2	20,1	6	26,2	8,9	3	21,8	12,5	6	0,14
PL-21	114,6	29,8	2	121,3	13,4	3	8,3	5,3	3	19,8	8,4	3	0,14
THP-1	122,9	33,8	4	100,0	13,3	5	2,5	1,2	3	12,0	6,0	5	0,12
siMCL1_735^a													
Kasumi-1	108,3	17,3	5	67,1	12,4	4	1,5	2,4	2	15,8	8,8	7	0,12
MV4-11	158,9		1	120,4	48,0	2	22,0	12,7	2	21,0	15,6	2	0,41
OCI-AML3	146,5	21,4	8	129,7	21,1	8	49,0	15,8	3	66,2	9,4	9	0,00
PL-21	121,1	68,4	2	72,7	11,2	3	15,0	3,2	3	31,3	3,9	3	0,02
THP-1	152,6	29,0	6	134,0	61,5	6	5,2	2,3	3	46,5	14,0	7	0,02
siMCL1_3989^a													
Kasumi-1	86,1	11,5	4	59,3	3,7	2				11,1	8,7	5	0,27
OCI-AML3	82,2	22,4	7	63,0	10,7	6	8,7		1	14,1	8,1	7	0,13
PL-21	36,9		1	78,3		1	3,4		1	19,6		1	
THP-1	72,1	10,3	5	65,3	8,4	4	4,5		1	45,0	10,6	5	0,01

^a Transfektion mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer Kontroll-siRNA. ^b Bestimmung der mRNA mit zwei unterschiedlichen qPCR-Testverfahren nach 24 h, prozentual im Vergleich zur ctrl-siRNA. ^c Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer nach 24 h. Der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben. ^d Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde das Verhältnis der Viabilität nach Stimulation zur Viabilität der ctrl-siRNA berechnet.

3.2.7 CDX2

Das *CDX2*-Gen ist ein Mitglied der *caudal-related homeobox*-Familie, welche bei der Embryogenese [162] und der Hämatopoese [163] eine wichtige Rolle spielen. Während *CDX2* in gesunden adulten hämatopoetischen Zellen nicht exprimiert wird, ist es

in einem Großteil der Patienten mit AML nachweisbar [164]. Wie Arbeiten anderer Gruppen zeigen konnten, führt einerseits eine verminderte *CDX2*-Expression zur Inhibition der Proliferation in AML-Zelllinien. Andererseits begünstigt eine aberrante *CDX2*-Expression die Selbsterneuerung in primären hämatopoetischen Zellen [164]. Um *CDX2* als mögliches Ziel einer siRNA zu untersuchen wurden unterschiedliche AML-Zelllinien mit zwei verschiedenen *CDX2*-spezifischen siRNAs (siCDX2_910 oder siCDX2_1087) transfiziert und anschließend, analog zu oben beschriebenen Targets, das *CDX2*-Expressionsniveau, der spezifische Zelltod und die Viabilität bestimmt (Tabelle 3.7).

Während ein *Knock-down* lediglich in der Zelllinie THP-1 zu beobachten war, zeigten die anderen Bedingungen keine Reduktion der *CDX2*-Expression. Allerdings führte dieser *Knock-down* in THP-1-Zellen nur zu einer geringen Reduktion der Viabilität (mit der siRNA siCDX2_910) und zu keiner Apoptoseinduktion. Die Induktion des spezifischen Zelltodes fiel auch bei den anderen Zelllinien sehr gering aus. Allerdings konnte hier trotz fehlendem Nachweis des *Knock-downs* bei MV4-11 und OCI-AML3-Zellen eine Reduktion der Viabilität nachgewiesen werden. Es bleibt also fraglich, ob es sich bei den beobachteten Effekten um Auswirkungen des spezifischen *Knock-downs* oder um *Off-target*-Effekte handelt.

Tabelle 3.7 Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität in AML-Zellen durch *CDX2-Knock-down*.

Zelllinie	Expressionsniveau ^b			spezifischer Zelltod ^c			Reduktion der Viabilität ^d			
	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	p-Wert
siCDX2_910^a										
MV4-11	211,3	74,3	5	4,3	2,0	2	17,6	12,1	5	0,22
OCI-AML3	91,6	21,1	6	5,0	0,7	2	14,9	3,2	6	0,01
PL-21	167,6	37,1	2	1,7		1	-20,3	16,8	2	0,44
THP-1	55,3	15,0	3	-2,1		1	7,9	8,6	4	0,43
siCDX2_1087^a										
MV4-11	135,4	34,1	5	4,1	0,4	2	17,7	17,2	5	0,36
OCI-AML3	100,2	34,7	6	3,6	2,2	2	7,6	7,1	6	0,34
PL-21	195,6	62,5	2	-0,4		1	-7,1	5,7	2	0,43
THP-1	37,5	4,6	3	-6,9		1	0,7	13,2	4	0,96

^a Transfektion mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer Kontroll-siRNA. ^b Bestimmung der mRNA mittels qPCR nach 24 h, prozentual im Vergleich zur ctrl-siRNA. ^c Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer nach 24 h. Der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben. ^d Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde das Verhältnis der Viabilität nach Stimulation zur Viabilität der ctrl-siRNA berechnet.

3.2.8 NPM1

Das Gen *NPM1* codiert für ein Protein, welches eine *Shuttle*-Funktion zwischen Nukleus und Zytoplasma inne hat [165] und dabei verschiedene Funktionen erfüllt. Beispielsweise ist es von Bedeutung bei der Entstehung von Ribosomen [166], der Embryogenese [167] und der Regulation der Apoptose [168]. Dieses Gen ist häufig in AML mutiert (siehe Tabelle 1.1) und führt zu einer zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins [169]. Arbeiten anderer Gruppen konnten im Mausmodell zeigen, dass eine *Npm1*-Mutation zur Initiierung einer AML führt [170].

Um die Auswirkungen eines *Knock-downs* dieses Gens zu untersuchen, wurden drei verschiedene siRNA in unterschiedliche AML-Zelllinien transfiziert, wobei zwei siRNAs (siNPM1_602 oder siRNA_1375) gegen alle *NPM1*-Varianten gerichtet waren und eine siRNA (siNPM1_mut) gegen die *NPM1*-Mutation der Zelllinie OCI-AML3. Die anderen untersuchten Zelllinien weisen keine Mutation in diesem Gen auf. Nach der Transfektion wurde das *NPM1*-Expressionsniveau bestimmt, sowie die Apoptose und die Viabilität der Zellen gemessen (Tabelle 3.8). Ein *Knock-down* war bei annähernd allen Bedingungen zu beobachten. Eine Induktion der Apoptose konnte in hinreichendem Umfang nur bei der Zelllinie OCI-AML3 nachgewiesen werden, hier jedoch trotz nachweisbarem *Knock-down* nur mit zwei der drei untersuchten siRNAs. Eine Reduktion

3 Ergebnisse

der Viabilität war in den Zelllinien Kasumi-1, OCI-AML3 und THP-1 nach Transfektion von siNPM1_602 zu beobachten, allerdings analog zur Apoptoseinduktion trotz nachgewiesenem *Knock-down* nicht nach Transfektion von siNPM1_1375. Die mutations-spezifische siRNA erzielte ähnliche Ergebnisse wie die siRNA siNPM1_602.

Tabelle 3.8 Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität in AML-Zellen durch NPM1-Knock-down.

Zelllinie	Expressionsniveau ^b			spezifischer Zelltod ^c			Reduktion der Viabilität ^d			
	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	MW (%)	SEM	n	p-Wert
siNPM1_602^a										
Kasumi-1	14,3	9,6	3	4,4	5,1	3	21,0	19,0	3	0,38
MV4-11	39,2	18,2	2	1,5	1,8	2	-5,2	0,1	2	0,02
OCI-AML3	8,8	1,3	3	23,8	11,6	3	20,9	22,6	4	0,42
PL-21	1,8	0,4	2	-2,0	2,2	2	-11,3	16,0	2	0,61
THP-1	5,3	1,9	3	1,7	3,8	3	13,8	18,5	3	0,53
siNPM1_1375^a										
Kasumi-1	83,9	66,0	3	3,5	2,8	3	-18,1	8,6	3	0,17
MV4-11	23,7	10,9	2	0,1	1,4	2	-7,4	14,2	2	0,70
OCI-AML3	12,5	4,5	3	-0,7	4,5	3	-14,6	31,8	4	0,68
PL-21	1,9	0,5	2	2,4	6,8	2	-22,9	22,8	2	0,50
THP-1	9,0	6,2	3	0,9	2,2	3	-22,1	15,6	3	0,29
siNPM1_mut^a										
OCI-AML3	33,3	7,7	3	33,1	14,6	3	20,0	17,3	4	0,33

^a Transfektion mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer Kontroll-siRNA. ^b Bestimmung der mRNA mittels qPCR nach 24 h, prozentual im Vergleich zur ctr-siRNA. ^c Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer nach 24 h. Der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben. ^d Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde das Verhältnis der Viabilität nach Stimulation zur Viabilität der ctrl-siRNA berechnet.

Zusammenfassend zeigen die oben beschriebenen Daten, dass einige Targets, wie *BRD4*, *FLT3*, *PLK1* und *AML1-ETO*, vielversprechende Zielgene einer siRNA-vermittelten RNA-Interferenz darstellen

Tabelle 3.9 Zusammenfassung von Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität in AML-Zellen durch verschiedene siRNAs

Target	siRNA ^a	Zelllinie	<i>Knock-down</i> ^b	spezifischer Zelltod ^c	Reduktion der Viabilität ^d
BRD4	siBRD4_1880	Kasumi-1	++	-	+
		MV4-11	++	-	-
		OCI-AML3	++	-	++

	siBRD4_2442	PL-21	++	-	-
		THP-1	++	-	-
		Kasumi-1	++	-	+
		MV4-11	-	-	-
		OCI-AML3	++	++	+
		PL-21	++	-	-
		THP-1	++	-	-
FLT3	siFLT3_1313	Kasumi-1	++	+	+
		MV4-11	-	-	+
		OCI-AML3	+	+	+
		PL-21	+	-	+
		THP-1	+	-	-
	siFLT3_2301	Kasumi-1	++	+	+
		MV4-11	-	+	++
		OCI-AML3	+	+	-
		PL-21	-	-	+
		THP-1	-	-	-
	siFLT3_mut	MV4-11	-	-	+
AML1-ETO	siAML1-ETO_7+12	Kasumi-1	-	+	++
		MV4-11	-	-	-
	siAML1-ETO_14+5	Kasumi-1	-	-	+
		MV4-11	-	-	-
PLK1	siPLK1_1069	Kasumi-1	+	+	++
		MV4-11	-	-	-
		OCI-AML3	-	++	++
		PL-21	-	+	+
		THP-1	-	+	+
	siPLK1_1424	Kasumi-1	++	+	++
		MV4-11	+	+	+
		OCI-AML3	+	++	++
		PL-21	+	+	++
		THP-1	++	++	++
WT1	siWT1_628	Kasumi-1	-	-	+
		MV4-11	-	++	++
		OCI-AML3	-	++	+
		PL-21	-	-	+
		THP-1	+	-	-
	siWT1_1424	Kasumi-1	-	-	+
		MV4-11	-	++	+
		OCI-AML3	-	++	+
		PL-21	-	-	-
		THP-1	+	+	-
MCL1	siMCL-1_670	Kasumi-1	-	++	-
		MV4-11	-	++	-

3 Ergebnisse

		OCI-AML3	-	++	+
		PL-21	-	++	+
		THP-1	-	++	+
	siMCL-1_735	Kasumi-1	-	++	+
		MV4-11	-	++	+
		OCI-AML3	-	++	++
		PL-21	-	++	++
		THP-1	-	++	++
	siMCL-1_3989	Kasumi-1	-	++	+
		OCI-AML3	-	++	+
		PL-21	+	++	+
		THP-1	-	++	++
CDX2	siCDX2_910	MV4-11	-	-	+
		OCI-AML3	-	+	+
		PL-21	-	-	-
		THP-1	-	-	-
	siCDX2_1087	MV4-11	-	-	+
		OCI-AML3	-	-	-
		PL-21	-	-	-
		THP-1	+	-	-
NPM1	siNPM1_602	Kasumi-1	++	-	+
		MV4-11	+	-	-
		OCI-AML3	++	++	+
		PL-21	++	-	-
		THP-1	++	-	+
	siNPM1_1375	Kasumi-1	-	-	-
		MV4-11	++	-	-
		OCI-AML3	++	-	-
		PL-21	++	-	-
		THP-1	++	-	-
	siNPM1_mut	OCI-AML3	+	++	+

^a Transfektion mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer Kontroll-siRNA. ^b Bestimmung der mRNA mittels qPCR nach 24 h, prozentual im Vergleich zur ctr-siRNA. *Knock-down* < 25 % (++) , 25 – 50 % (+) oder > 50 % (-). ^c Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V Bindung im Durchflusszytometer nach 24 h. Der spezifische Zelltod wurde berechnet wie in Material und Methoden angegeben. Spezifischer Zelltod > 15 % (++) , 5 – 15 % (+) oder > 5 % (-). ^d Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach zwei oder drei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Es wurde das Verhältnis der Viabilität nach Stimulation zur Viabilität der ctrl-siRNA berechnet. Reduktion der Viabilität > 30 % (++) , 10 - 30 % (+) oder < 10 % (-).

3.3 Analyse der Kombination von RIG-I-Aktivierung und Target-spezifischem *Knock-down*

Wie unter 1.6 beschrieben konnte bei der Kombination von spezifischem *Knock-down* mittels siRNA und RIG-I-Aktivierung durch 5'-Triphosphat-RNA sowohl in Zellen des Pankreaskarzinoms [67], als auch in Melanomzellen [65] ein ausgeprägter Effekt gegen Tumorzellen gezeigt werden. Im Folgenden soll nun dargestellt werden, welche Auswirkungen diese Kombination in AML-Zellen hat.

Die Evaluation unterschiedlicher potentieller siRNA-Targets in den verschiedenen AML-Zelllinien zeigte insbesondere für den *Knock-down* von *BRD4*, *FLT3*, *PLK1* und *WT1* einen zytoreduktiven Effekt. Auch der zielgerichtete Einsatz von siRNAs, die gegen AML-typische Mutationen in *FLT3*, *AML1-ETO* und *NPM1* gerichtet waren, führte in den entsprechenden mutationstragenden Zelllinien zu einer Apoptoseinduktion sowie Viabilitätsreduktion, während sich die AML-Zelllinien ohne die entsprechende Mutation weitgehend resistent zeigten. Für weitergehenden Analysen wurde jedoch ein Zielgen verwendet, welches in einem breiten Spektrum an AML-Zelllinien exprimiert wird, sodass ein möglicher Effekt in verschiedenen Zellen evaluiert werden kann. Für die Targets *BRD4*, *FLT3* und *PLK1* konnten die oben beschriebenen Ergebnisse robust reproduziert werden und außerdem ist hier aufgrund des nachweisbaren *Knock-downs* von *on-target* Effekten auszugehen. Während bei einem *Knock-down* von *PLK1* teilweise eine stark ausgeprägte Reduktion der Viabilität sowie Apoptoseinduktion beobachtet werden konnte, zeigten *BRD4* und *FLT3* in diesen Read-outs etwas geringer ausgeprägte Effekte. Um mögliche additive Effekte einer RIG-I Induktion beobachten zu können wurden für weitere Experimente die Zielgene *BRD4* und *FLT3* ausgewählt, bei *PLK1* könnten etwaige zusätzlichen Effekte nach Möglichkeit schwieriger zu evaluieren sein. Deshalb wurden im Weiteren die siRNA-Targets *BRD4* und *FLT3* für weitere Versuche ausgewählt.

3.3.1 Kombination von RIG-I-Aktivierung und *Knock-down* weist additive Effekte bei der Reduktion der Viabilität auf

Um die Effekte der Aktivierung von RIG-I und des simultanen *Knock-downs* von *BRD4* zu untersuchen, wurden zunächst die entsprechenden Moleküle, 5'-Triphosphat-RNA und siRNA, gleichzeitig wenn auch als zwei getrennte Moleküle in verschiedene AML-Zelllinien transfiziert. siBRD4_1880 wurde als *BRD4*-spezifische siRNA gewählt; diese

3 Ergebnisse

wird im Weiteren nur mit siBRD4 bezeichnet. Als Negativkontrolle der mittels IVT (siehe 2.3.4) hergestellten 5'-Triphosphat-RNA diente eine OH-RNA ohne stimulatorisches 5'-Triphosphat-Ende und die Negativkontrolle der siRNA war die unter 3.2.1 beschriebene Kontroll-siRNA.

Nach der Transfektion wurde zunächst mittels qPCR die *BRD4*-Expression ermittelt (Abbildung 3.6 A). Hierbei zeigte sich sowohl bei alleinigem *Knock-down*, als auch bei zusätzlicher Transfektion der 5'-Triphosphat-RNA eine verminderte *BRD4*-Expression. Dies deutet darauf hin, dass die zusätzliche Transfektion der 5'-Triphosphat-RNA den *Knock-down* nicht beeinträchtigt. Zur Analyse der RIG-I-Stimulation durch 5'-Triphosphat-RNA wurde sowohl die *RIG-I*-Expression (Abbildung 3.6 B) als auch die *IP-10*-Expression (Abbildung 3.6 C) ermittelt. Hier konnte nur nach Transfektion des RIG-I-Liganden eine RIG-I-Aktivierung beobachtet werden, welche allerdings durch die simultane Transfektion von siBRD4 vermindert war.

Die Kombination beider Moleküle zeigte außerdem eine signifikant reduzierte Viabilität über einen Zeitraum von fünf Tagen, in Abbildung 3.6 D exemplarisch für die Zelllinie Kasumi-1 dargestellt. Während sowohl der alleinige *Knock-down* und als auch die alleinige RIG-I-Stimulation zu einer verminderten Viabilität führten, konnte bei der Kombination ein additiver Effekt auf die Reduktion der Viabilität festgestellt werden.

Abbildung 3.6 E zeigt, dass die Kombination hinsichtlich der Zellviabilität in Kasumi-1 und OCI-AML3 einen signifikanten Unterschied hervorrief, während in MV4-11 und PL-21 nur geringe Effekte nachzuweisen waren. Unverändert blieb die Viabilität in PL-21-Zellen nach Kombination der beiden Moleküle, im Vergleich zur Transfektion der einzelnen Komponenten.

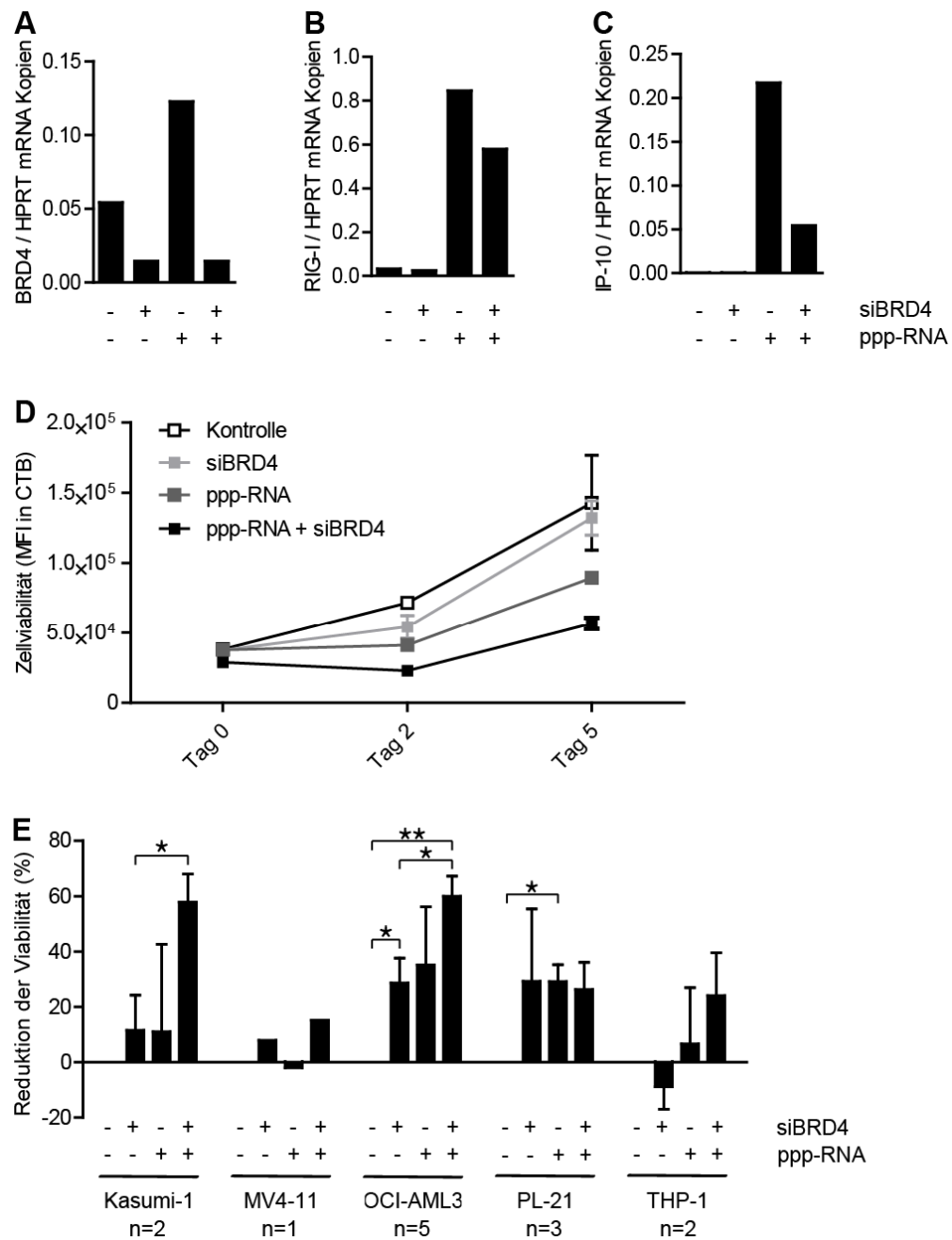


Abbildung 3.6 Die Kombination von RIG-I-Aktivierung und BRD4-Knock-down weist additive Effekte auf die Reduktion der Viabilität auf. Transfektion von siBRD4 oder 5'-Triphosphat-RNA oder siBRD4 zusammen mit 5'-Triphosphat-RNA mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer nicht stimulierenden OH-RNA und einer Kontroll-siRNA. **(A - D)** Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch der Zelllinie Kasumi-1. Die RNA wurde nach 24 Stunden mittels qPCR auf die Expression von BRD4 **(A)**, RIG-I **(B)** beziehungsweise IP-10 **(C)** analysiert und als Kopien pro HPRT-Kopien dargestellt. **(D)** Die Messung der Viabilität erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus einem Versuch mit Triplikaten. **(E)** Transfektion in fünf verschiedene AML-Zelllinien und anschließende Messung der Zellviabilität nach zwei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Berechnung der Reduktion der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle und Ermittlung des Mittelwerts mit Standardfehler aus der in der Abbildung angegebenen Anzahl (n) von identisch aufgebauten Versuchen. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden die Kontrolle gleich null gesetzt.

Analog zur Kombination von RIG-I-Ligand und siBRD4 wurde bei der Kombination von RIG-I-Ligand und siFLT3 vorgegangen. Als *FLT3*-spezifische siRNA wurde die siFLT3_1313 ausgewählt, welche im Folgenden nur als siFLT3 bezeichnet wird. Bei der Analyse des *FLT3*-Expressionsniveaus nach *Knock-down* konnte beobachtet werden, dass die simultane Transfektion der 5'-Triphosphat-RNA die *Knock-down*-Effizienz nicht beeinträchtigte (Abbildung 3.7 A). Die Stimulation von RIG-I führte sowohl zu einer gesteigerten *RIG-I*-Expression (Abbildung 3.7 B) als auch zu einer gesteigerten *IP-10*-Expression (Abbildung 3.7 C). Allerdings hatte die zusätzliche Transfektion der siRNA, verglichen mit der alleinigen Transfektion der 5'-Triphosphat-RNA, eine verminderte RIG-I-Aktivierung zur Folge.

Die Kombination aus RIG-I-Stimulation und *FLT3*-spezifischem *Knock-down* führte über einen Zeitraum von fünf Tagen zu einer signifikant verminderten Zellviabilität (Abbildung 3.7 D). Jedoch resultierte die alleinige Transfektion des RIG-I-Liganden schon in einer ausgeprägten Reduktion der Viabilität. Die alleinige Transfektion der siRNA hingegen hatte vergleichsweise geringe Effekte, sodass die Kombination beider Moleküle hier keine zusätzlichen Auswirkungen auf die Viabilität hatte.

Dennoch konnte mehrheitlich in den AML-Zelllinien nach simultaner Transfektion von 5'-Triphosphat-RNA und einer *FLT3*-spezifischen siRNA ein additiver Effekt bezüglich der Reduktion der Viabilität nachgewiesen werden, im Besonderen in Kasumi-1- und OCI-AML3-Zellen (Abbildung 3.7 E). In MV4-11-Zellen konnte trotz nicht vorhandenem Effekt der alleinigen RIG-I-Stimulation bei der Kombination mit *FLT3-Knock-down* eine zusätzliche Verminderung der Viabilität beobachtet werden. Während die Zelllinie THP-1 ebenfalls eine verstärkte Reduktion bei Kombination Transfektion beider Moleküle aufwies, zeigte die Zelllinie PL-21 keine additiven Effekte.

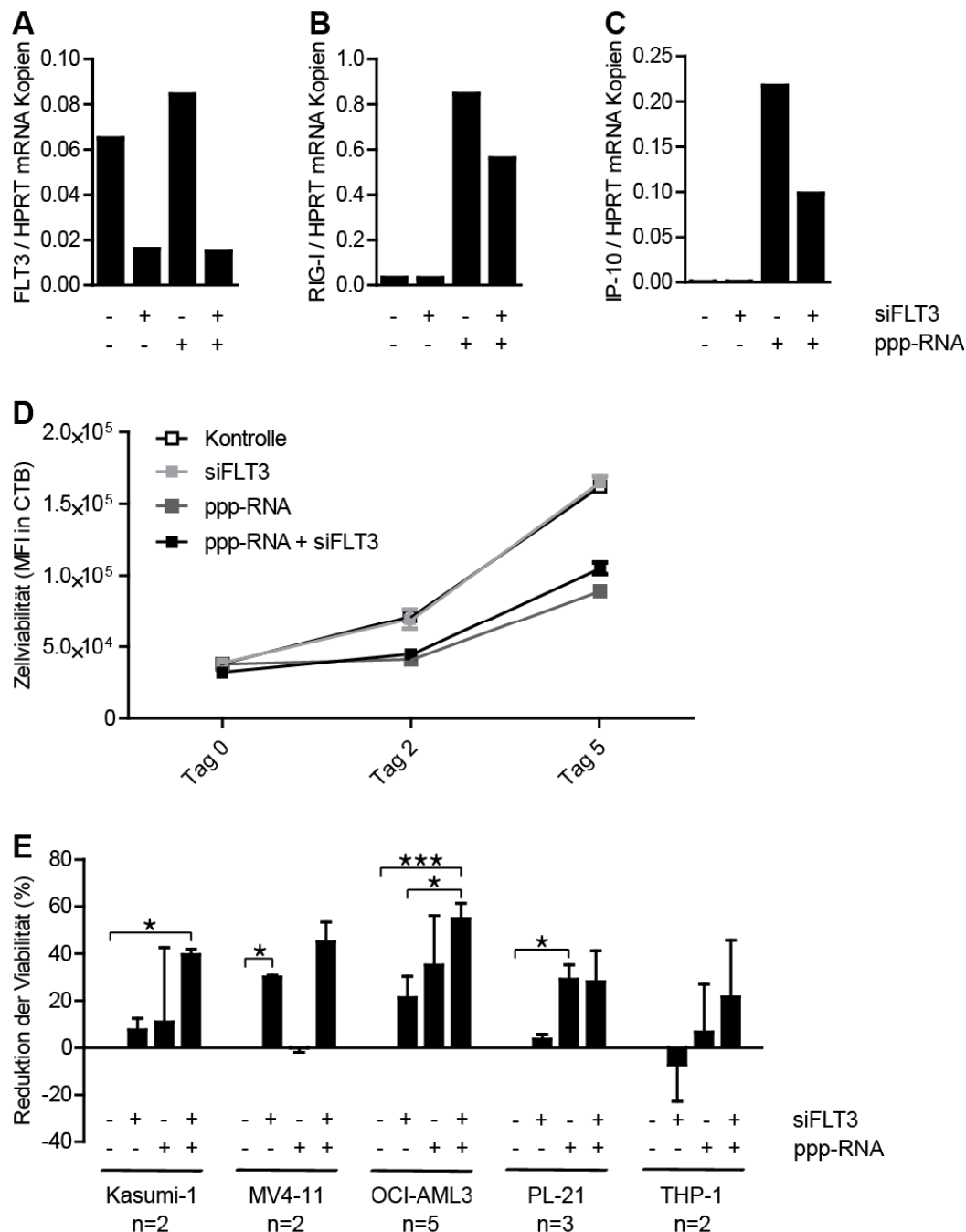


Abbildung 3.7 Kombination von RIG-I-Aktivierung und FLT3-Knock-down auf die Zellviabilität. Transfektion von verschiedenen RNAs mittels Elektroporation. Als Kontrolle diente die Transfektion einer nicht stimulierenden OH-RNA und einer Kontroll-siRNA. **(A - D)** Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch der Zelllinie Kasumi-1. Analyse der RNA nach 24 Stunden mittels qPCR auf die Expression von FLT3 **(A)**, RIG-I **(B)** beziehungsweise IP-10 **(C)** und Darstellung als Kopien pro HPRT-Kopien. **(D)** Die Messung der Viabilität erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus einem Versuch mit Triplikaten. **(E)** Transfektion in fünf verschiedene AML-Zelllinien und anschließende Messung der Zellviabilität nach zwei Tagen mittels *CellTiter-Blue*. Berechnung der Reduktion der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle und Ermittlung des Mittelwerts mit Standardfehler aus n=x identisch aufgebauten Versuchen. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden die Kontrolle gleich null gesetzt.

3.3.2 Bifunktionelle siRNAs: Effekte der Kombination von RIG-I-Aktivierung und *Knock-down* in einem Molekül auf AML-Zelllinien

Im Weiteren wurden die siRNAs gegen *BRD4* und *FLT3* hinsichtlich der Wirkung als bifunktionelle siRNAs untersucht. Dazu wurden die verwendeten siRNA-Sequenzen mittels IVT hergestellt und dabei (siehe 2.3.4) mit einem Triphosphat-Rest am 5'-Ende modifiziert, um so die Effekte von RIG-I-Stimulation und des *Knock-downs* in eine Verbindung zu vereinen. Bei den verwendeten siRNAs handelt es sich um einen Doppelstrang, welcher zytoplasmatisch in zwei Einzelstränge getrennt wird. Von diesen zwei RNA-Strängen ist nur der Antisense-Strang für die gewünschte RNA-Interferenz verantwortlich. Mit Hilfe der IVT kann nun entweder ausschließlich an Sense-Strang ein 5'-Triphosphat-Rest angehängt werden, sodass eine 5'-Triphosphat-RNA und eine OH-siRNA im Zytoplasma entstehen. Dieses Molekül wird im Folgenden mit ppp-OH-siRNA beschrieben. Oder es kann mittels IVT an Sense- und an Antisense-Strang ein Triphosphat-Rest am 5'-Ende synthetisiert werden, dieses wird weiterhin als ppp-ppp-siRNA bezeichnet.

Abbildung 3.8 A zeigt eine Induktion der IP-10-Produktion nach Transfektion der unterschiedlichen stimulatorischen *BRD4*-spezifischen siRNAs. Während ppp-ppp-siBRD4 eine signifikante Steigerung der IP-10-Produktion bewirken konnte, zeigte sich dieser Effekt bei ppp-OH-siBRD4 in geringerem Ausmaß. Die Viabilität war mit der bifunktionellen siRNA gegen *BRD4* (ppp-ppp-siBRD4) in vergleichbarem Ausmaß reduziert wie mit der simultanen Transfektion der beiden entsprechenden Moleküle (Abbildung 3.8 B).

Ebenso konnte nach Transfektion der bifunktionellen *FLT3*-spezifischen siRNA eine signifikante Induktion der IP-10-Sekretion beobachtet werden (Abbildung 3.8 C). Allerdings führte nur ppp-ppp-siFLT3 zu einer ähnlichen Steigerung der Zytokinproduktion verglichen mit der separaten Transfektion der Moleküle (ppp-RNA + siFLT3). ppp-OH-siFLT3 zeigte wie schon die bifunktionellen siRNA gegen *BRD4* eine geringer ausgeprägte Induktion. Auffallend ist an dieser Stelle die nahezu identische IP-10-Sekretion der Bedingungen ppp-RNA und ppp-RNA+siFLT3, sodass hier, anders als bei Abbildung 3.7 C, von keiner verminderten RIG-I-Aktivierung bei zusätzlicher Transfektion der siRNA auszugehen ist. Einschränkend ist allerdings zu bemerken, dass in diesem Versuch unter Abbildung 3.8 andere Zellen verwendet (OCI-AML3 anstatt Kasumi-1), die Art der Transfektion divergierte (Lipofektion anstatt Elektroporation) und IP-10 auf

unterschiedliche Art bestimmt wurde (ELISA anstatt qPCR), sodass die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar sind. Aus Abbildung 3.8 D geht hervor, dass die bifunktionelle siRNA gegen *FLT3*, wie die simultane Transfektion beider RNAs, zu einer vergleichbaren Reduktion der Viabilität führt.

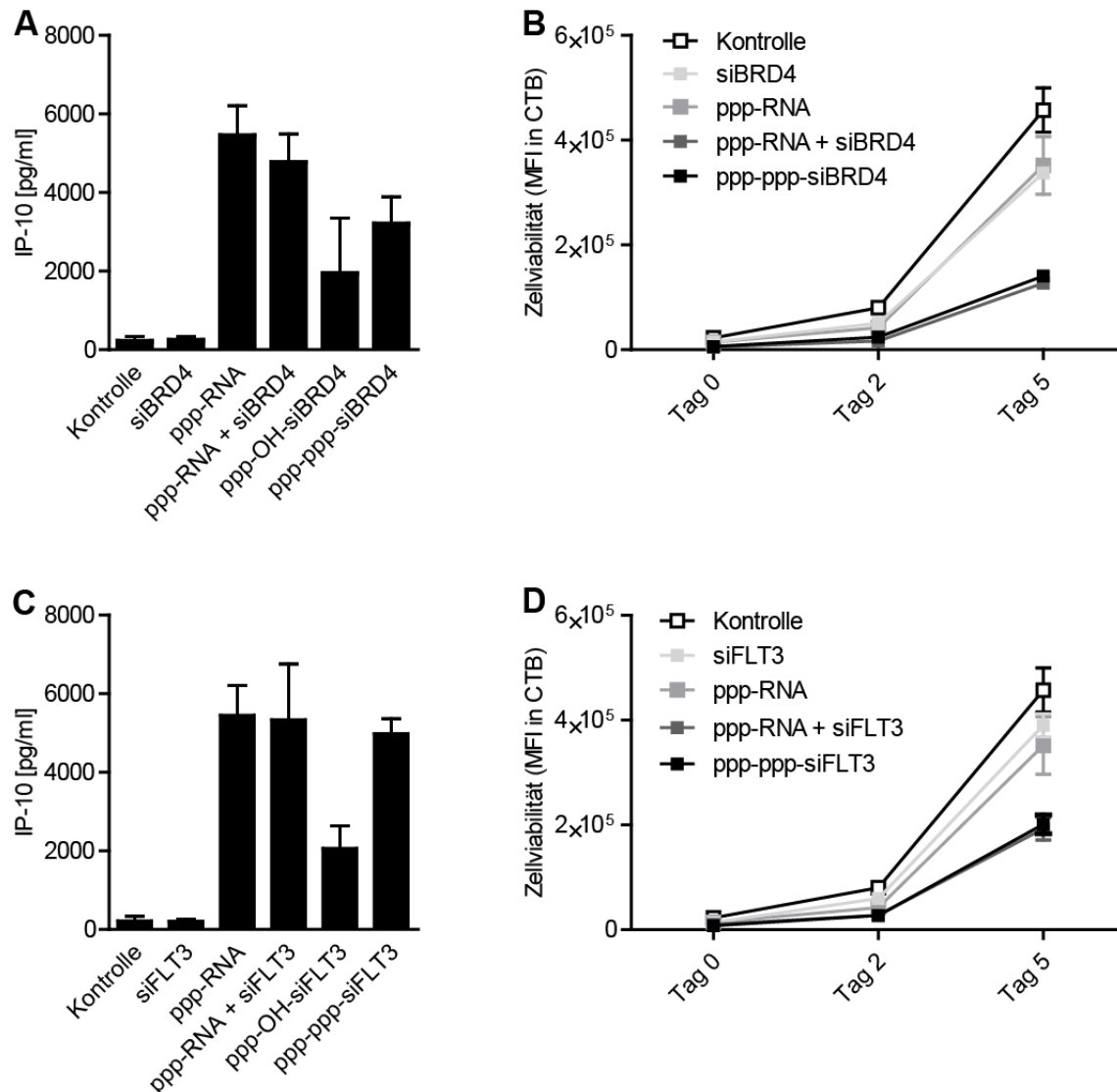


Abbildung 3.8 Gegen BRD4 oder FLT3 gerichtete bifunktionelle ppp-siRNAs induzieren die RIG-I-Stimulation und reduzieren die Zellviabilität. Transfektion von verschiedenen RNAs mit Interferenzeigenschaften gegen BRD4 (**A, B**) oder FLT3 (**C, D**) in OCI-AML3-Zelle. Als Kontrolle diente die Transfektion einer nicht stimulierenden OH-RNA und einer Kontroll-siRNA. (**A, C**) 24 h nach Lipofektion wurde der Überstand geerntet und die IP-10 Konzentration im ELISA bestimmt. Dargestellt ist die mittlere IP-10-Konzentration mit Standardabweichung aus einem repräsentativen Versuch mit Triplikaten. (**B, D**) Die Messung der Viabilität erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen nach Elektroporation mittels *CellTiter-Blue*. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus einem Versuch mit Triplikaten.

Zusammenfassend zeigen die oben beschriebenen Ergebnisse, dass in einer bifunktionellen siRNA, sowohl gegen *BRD4* als auch gegen *FLT3*, effektiv die siRNA-vermittelte Interferenz mit der 5'-Triphosphat-RNA-vermittelten RIG-I-Aktivierung kombiniert werden kann und zu einer additiven zytotoxischen Wirkung auf AML-Zelllinien führen kann.

3.4 DNA-basierte Nanopartikel als neue Strategie zum zielgerichteten Transport von siRNA

Bei DNA-basierten Nanopartikeln handelt es sich um eine vielversprechende neue Transportmöglichkeit für unterschiedliche Moleküle oder Medikamente. Diese Methode wurde in mehreren Bereichen experimentell angewendet, darunter der Transport von siRNAs [171], Antikörpern [105] und immunstimulatorischen Molekülen [101, 107]. Da zum einen die transiente Transfektion von siRNA *in vitro* große Schwankungen aufweist und zum anderen der zielgerichtete Transport der siRNA *in vivo* bisher nicht möglich ist, bietet das Prinzip der DNA-basierten Nanopartikeln eine aussichtsreiche Möglichkeit dies zu verbessern.

3.4.1 DNA-basierte Nanopartikel werden von HeLa-Zellen endosomal und unabhängig von Folat aufgenommen

Es wurden HeLa-Zellen mit DNA-basierten Nanopartikeln inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels konfokaler Mikroskopie auf deren Aufnahme untersucht. Die DNA-Nanopartikel sind wie unter 2.1.6 beschrieben angefertigt und enzymatisch mit Atto 488 markiert. Gleichzeitig wurde eine Visualisierung der Endosomen mit Dextran-AF647 durchgeführt. Nach 24 Stunden und nach 72 Stunden zeigte sich eine endosomale Kolokalisation der aufgenommenen Nanopartikeln mit Dextran (Abbildung 3.9 A-C zeigt das Bild nach 24 Stunden).

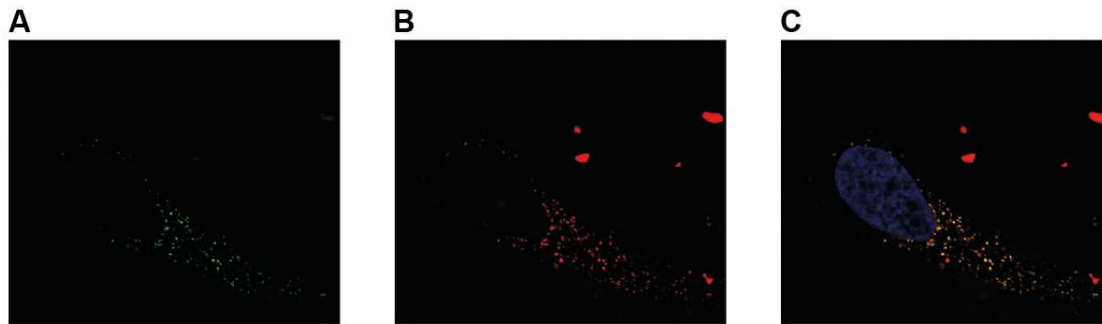


Abbildung 3.9 Endosomale Aufnahme der Nanopartikel in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 24 h mit Nanopartikeln **(A)** und dem Endosomenmarker Dextran-AF647 **(B)** inkubiert. Die Nanopartikel sind angefertigt wie in Material und Methoden beschrieben und kovalent mit dem Fluorochrom Atto 488 markiert. **(C)** Überlagerung von **(A)**, **(B)** und einem dritten Kanal zum Anfärben des Nukleus mit Hoechst 33342 zeigt die Kolokalisation von Nanopartikeln und Endosomen.

Folat-Rezeptoren triggern die endosomale Aufnahme von Folsäure und werden in vielen Tumorzellen überexprimiert. Um sich diesen Effekt zu Nutze zu machen, wurden die DNA-basierten Nanopartikel kovalent mit Folat-Rezeptor-Liganden verbunden und anschließend die Auswirkung auf eine zelluläre Aufnahme untersucht. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit Nanopartikeln und den daran gebundenen Folat-Rezeptor-Liganden inkubiert und anschließend mithilfe des konfokalen Mikroskops analysiert. Als Kontrolle dienten die gleichen Nanopartikel ohne Folat-Rezeptor-Ligand. Wie Abbildung 3.10 A bis D zu entnehmen ist, führte ein zusätzlicher Folat-Rezeptor Ligand zu keiner qualitativen oder wesentlichen quantitativen Änderung der Aufnahme. Es zeigte sich unter beiden Bedingungen eine endosomale Aufnahme. Auch im zeitlichen Verlauf über 72 Stunden blieb dieses Bild unverändert.

Um die endosomale Aufnahme zu quantifizieren und eine mögliche Folatabhängigkeit weiter zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit diesen Nanopartikeln inkubiert und mittels Durchflusszytometrie zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Abbildung 3.10 E). Die Aufnahme der Nanopartikel nahm im zeitlichen Verlauf zu, es konnte jedoch kein Unterschied in der Aufnahmegeschwindigkeit zwischen Nanopartikeln mit und ohne Folat beobachtet werden. Auch der Vergleich zwischen HeLa-Zellen, die eine hohe Expression des Folat-Rezeptors aufweisen, und A549-Zellen, einer Folat-Rezeptor-defizienten Zelllinie, zeigte sich in der Durchflusszytometrie kein Unterschied bezüglich der Aufnahme (Abbildung 3.10 F).

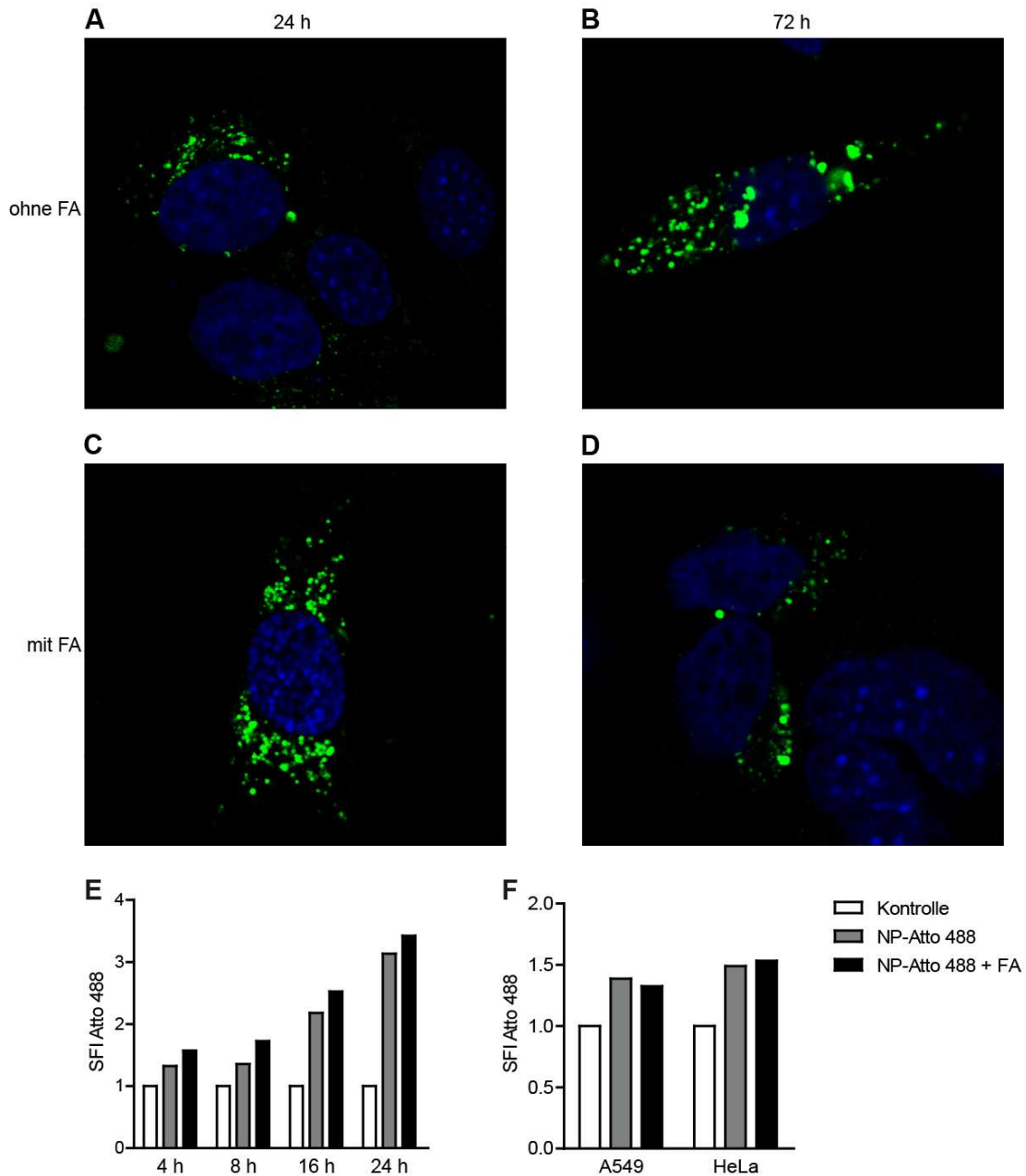


Abbildung 3.10 Endosomale Aufnahme der Nanopartikel ist unabhängig von Folat-Rezeptor-Liganden. Inkubation der Zellen mit Nanopartikeln. Diese sind angefertigt wie in Material und Methoden beschrieben und kovalent mit dem Fluorochrom Atto 488 markiert. **(A-D)** Inkubation von HeLa-Zellen mit Nanopartikeln (in Grün dargestellt) ohne Folat-Rezeptor Liganden **(A, B)** und mit Folat-Rezeptor Liganden **(C, D)** für 24 h **(A, C)** oder 72 h **(B, D)**. Anfärben des Nukleus mit Hoechst 33342 (in Blau dargestellt). **(E)** Inkubation von HeLa-Zellen mit Nanopartikeln mit oder ohne Folat an der Oberfläche über einen Zeitraum von 24 h. Bestimmung der Aufnahme der Nanopartikel im Durchflusszytometer und Darstellung als spezifische Fluoreszenzintensität (SFI). Diese wurde berechnet wie in Material und Methoden erklärt. Als Kontrolle dienten unbehandelte HeLa-Zellen. **(F)** Inkubation von A549- oder HeLa-Zellen mit Nanopartikeln mit oder ohne Folat-Rezeptor Ligand an der Oberfläche und Bestimmung des SFI nach vier Stunden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

3.4.2 An Nanopartikel gebundene siRNA wird nicht zytoplasmatisch freigesetzt

Um die zytoplasmatische Freisetzung und Funktion einer Nanopartikel-gebundenen siRNA zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen zunächst mit GFP transduziert. Eine *GFP*-spezifische siRNA (siGFP) wurde kovalent an die beschriebenen Nanopartikel gebunden (NP + siGFP), um dann die GFP-transduzierten HeLa-Zellen mit diesem Molekül zu inkubieren. Der Nanopartikel war entweder zusätzlich mit Folat konjugiert (NP + FA beziehungsweise NP + siGFP + FA) oder nicht mit Folat konjugiert (NP beziehungsweise NP + siGFP). Wie Abbildung 3.11 zu entnehmen ist, reduzierte die an Nanopartikeln gebundene siRNA nicht die GFP-Expression. Es kann allerdings von einer hinreichenden *Knock-down*-Effizienz der hier verwendeten siRNA ausgegangen werden, da die alleinige Transfektion der *GFP*-spezifischen siRNA mittels Lipofektion zu einer ausgeprägten Verminderung der GFP-Expression führte. Die etwas verminderte Fluoreszenzintensität bei allen Bedingungen nach Inkubation mit Nanopartikeln kann als eine Aufnahme dieser in die HeLa-Zellen gewertet werden. Diese Nanopartikel waren ebenfalls mit dem fluoreszierenden Farbstoff Atto 647 markiert, was trotz Analyse in unterschiedlichen Kanälen des Durchflusszytometers zu Interferenzen führen kann. Der fehlende *Knock-down* nach Inkubation, mit der an die Nanopartikel gebundenen siRNA lässt vermuten, dass eine zytoplasmatische Freisetzung der siRNA nicht in ausreichendem Maße stattgefunden hat. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl in An- wie Abwesenheit eines Folatrezeptor-Liganden auf der Oberfläche des Nanopartikels.

3 Ergebnisse

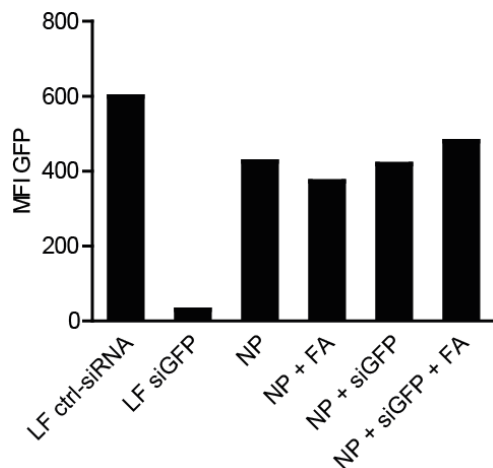


Abbildung 3.11 An Nanopartikel gebundene siRNA wird nicht zytoplasmatisch freigesetzt. Inkubation von GFP-exprimierenden HeLa-Zellen mit Nanopartikeln. An diese sind siRNAs gegen *GFP* (+ siGFP) oder Folat (+ FA) oder beide Moleküle (+ siGFP + FA) kovalent gebunden. Messung der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer nach 96 h und Darstellung der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) von GFP. Als Kontrolle diente die Transfektion einer gegen *GFP* gerichtete siRNA (siGFP) oder einer Kontroll-siRNA (ctrl-siRNA) mit Lipofektion (LF). Dargestellt ist ein Versuch mit Unikaten, repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Versuche, dass diese DNA-basierten Nanopartikel endosomal aufgenommen werden und dort auch nach 72 Stunden noch zu lokalisieren sind. Auch wird diese Aufnahme nicht von Folat-Liganden modifiziert. Aufgrund eines fehlenden *Knock-downs* durch eine an Nanopartikel gebunden siRNA ist nicht von einer zytoplasmatischen Freisetzung der siRNA auszugehen.

3.4.3 Extra-endosomale Aufnahme kann durch Abspaltung des Fluorochroms vorgetäuscht werden

Wurden die Nanopartikel nicht wie in Abbildung 3.9 und 3.10 dadurch visualisiert, dass beim Aufbau des Nanopartikels, 40-mer Oligonukleotide verwendet wurden, an die enzymatisch am 3' Ende ein mit dem Farbstoff Atto 488 markiertes UTP angehängt wurde waren, sondern durch Hybridisierung über Van-der-Waal Kräfte eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto 647 über ein NHS-Verfahren markierten Oligos mit 18 Basen Überlappung (siehe 2.1.6) zeigte sich nach Inkubation von Hela-Zellen mit diesen Partikeln ebenfalls eine starke Aufnahme des Fluorochroms, sowohl in der Durchflusszytometrie, als auch in der Konfokalmikroskopie. Es konnte allerdings keine Kollokalisierung mit dem Endosomenmarker Dextran-AF488 dargestellt werden (Abbildung 3.12 A). Stattdessen zeigte sich eine mitochondriale Lokalisation des Atto 647 Farbstoffes (Abbildung 3.12 B). Diese Tatsache, ebenso wie die gesteigerte Aufnahme, war

abhängig von der Zugabe des Mediumzusatzes FCS. So konnte nach Inkubation in einem FCS-freien DMEM-Medium eine extramitochondriale Aufnahme des Fluorochroms beobachtet werden (Abbildung 3.12 C), wohingegen bei Zugabe von 10 % FCS eine mitochondriale Kolokalisation gezeigt werden konnte (Abbildung 3.12 D).

Wurden Oligonukleotide mit Hilfe der von NHS-Chemie (Hybridisierungstechnik) mit Atto 647 (ODN-Atto 647) markiert (siehe 2.1.6) und mit HeLa-Zellen inkubiert, konnte nach Zugabe von 10 % FCS eine schnellere und in der Intensität gesteigerte Aufnahme des Farbstoffes ermittelt werden (Abbildung 3.12 E). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Dieser schnellen Anreicherung der Fluorochrome in Mitochondrien könnten mehrere Ursachen zu Grunde liegen. Zum einen kann der Nanopartikel als solcher endosomal aufgenommen werden und zum Mitochondrium transportiert werden, wo er sich anreichert. Da jedoch zu keinem Zeitpunkt eine endosomale Aufnahme beobachtet werden konnte, ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich. Zum anderen kann sich die Bindung von markiertem Oligonukleotid und Nanopartikel gelöst haben (siehe 2.1.6). Diese Bindung kann sich insbesondere durch die Zugabe von Nukleasen im Serum gelöst haben, sodass einzelne Oligonukleotide, inklusive ihrer Fluorochrommarkierung, in Mitochondrien eingelagert und dort detektiert werden. Als dritte Möglichkeit kann durch im Serum enthaltene Enzyme entweder der mittels NHS-Chemie verbundene Farbstoff an sich oder einzelne Farbstofftragende Nukleotide abgespalten werden und diese sich dann in Mitochondrien anreichern. Um der Frage nach zu gehen, ob Serum zu einer Auflösung der Bindung zwischen den einzelnen Oligonukleotiden oder zu einer Abspaltung der Fluorochrome an sich kommt, wurden Fluorochrome-markiertes UTP enzymatisch (siehe 2.1.6) in die Basis-Oligonukleotide des Nanopartikels eingebaut. Nach diesem enzymatischen Einbau der Fluorochrome, konnte in Folge der Zugabe von Serum weder eine verstärkte Aufnahme der Nanopartikeln noch der Oligonukleotide beobachtet werden (Abbildung 3.12 F). Dies lässt die dritte Möglichkeit als die wahrscheinlichste Erklärung für die mitochondrial lokalisierte und durch FCS verstärkte Aufnahme des Fluorochroms erscheinen.

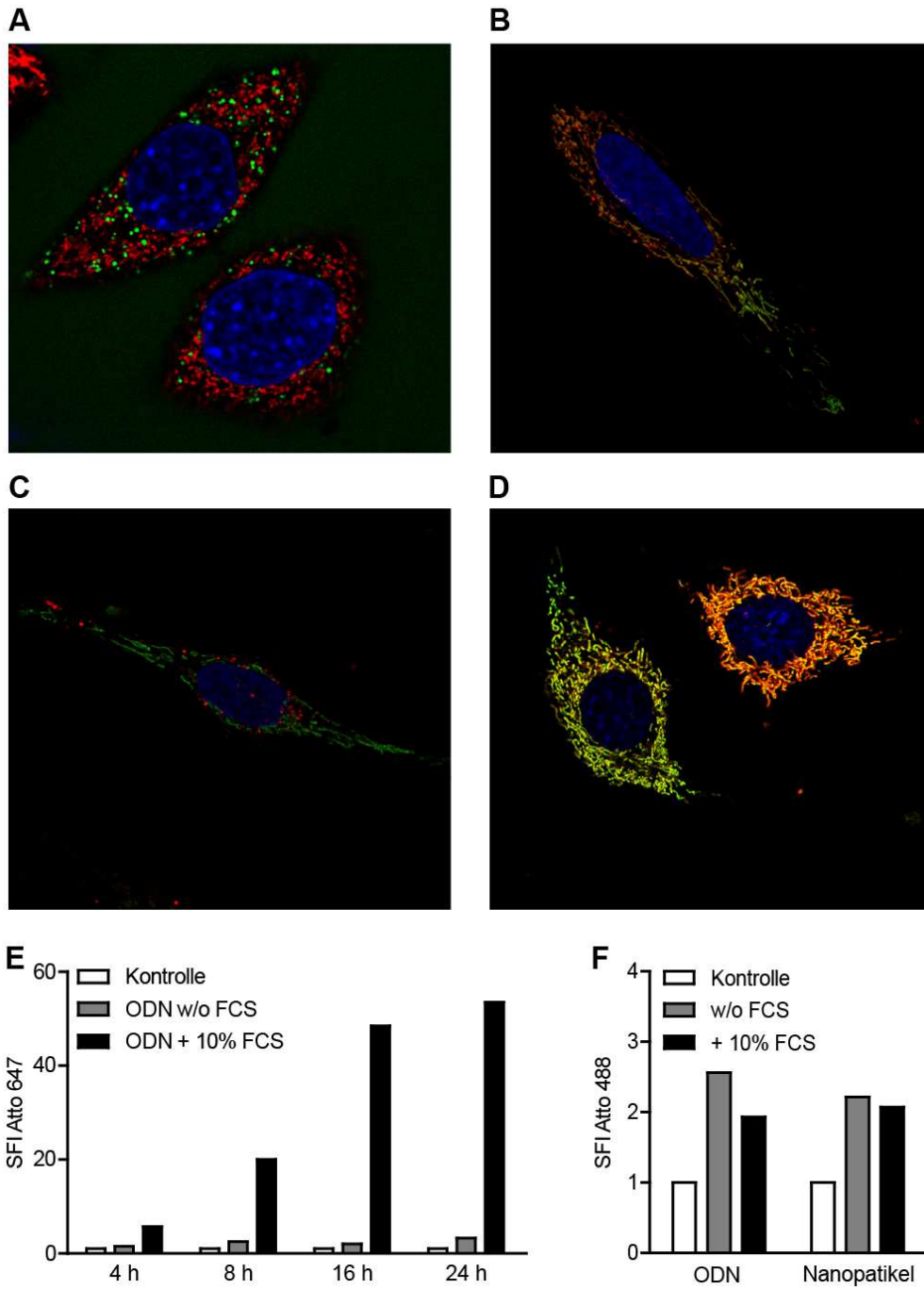


Abbildung 3.12 Abspaltung des Fluorochroms suggeriert mitochondriale Aufnahme der Nanopartikel. (A-D) Inkubation von HeLa-Zellen mit Nanopartikeln (in Rot dargestellt). Die Nanopartikel sind angefertigt wie in Material und Methoden beschrieben und mittels Hybridisierung mit dem Fluorochrom Atto 647 markiert. Anfärben des Nukleus mit Hoechst 33342 (in Blau dargestellt). **(A, B)** Analyse nach 16 h in Medium (DMEM) mit 10 % FCS-Zusatz. **(A)** Markierung der Endosomen mit Dextran-AF488 (in Grün dargestellt) zeigt keine Kolo-kalisation mit Nanopartikeln bzw. dem Farbstoff Atto 647. **(B)** Markierung der Mitochondrien mit *MitoTracker Green* (in Grün dargestellt) zeigt Kolo-kalisation mit dem Farbstoff Atto 647 der zur Markierung der Nanopartikel verwendet wurde. **(C, D)** Inkubation für 24 h in Medium (DMEM) und Markierung der Mitochondrien mit *MitoTracker Green* (in Grün dargestellt). **(C)** Verwendung von Medium ohne FCS zeigt keine Kolo-kalisation. **(D)** Inkubation in Medium mit 10 % FCS dokumentiert Kolo-kalisation. **(E)** HeLa-Zellen wurden mit Oligonukleotiden (ODN) in Medium (DMEM) mit oder ohne Zusatz von 10 % FCS inkubiert. Die Oligonukleotide sind angefertigt wie in Material und Methoden beschrieben und mittels Hybridisierung mit dem Fluorochrom Atto 647 markiert. Die Aufnahme der Oligonukleotide wurde über einen Zeitraum von 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. **(F)** HeLa-Zellen wurden mit Oligonukleotiden (ODN) oder mit Nanopartikeln in Medium (DMEM) mit oder ohne Zusatz von 10 % FCS inkubiert. Die Moleküle sind angefertigt wie in Material und Methoden beschrieben und enzymatisch mit dem Fluorochrom Atto 488 markiert. Die Aufnahme wurde nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. **(E, F)** Dargestellt ist die spezifische Fluoreszenzintensität (SFI). Diese wurde berechnet wie in Material und Methoden erklärt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

3.4.4 Einzelsträngige DNA-Moleküle, aber nicht Desoxynukleotid-Triphosphate, werden gleichermaßen aufgenommen wie DNA-basierte Nanopartikel

Um die Aufnahme der Nanopartikel und dessen Bestandteile genauer zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen jeweils mit Desoxynukleotid-Triphosphaten (dUTP-Atto488), Oligonukleotiden (ODN-Atto488) oder Nanopartikeln (NP-Atto488) inkubiert. Bei dUTP-Atto488 handelt es sich um die Moleküle, welche für das Labeln der Oligonukleotide und damit der Nanopartikel verwendet wurden. Oligonukleotide sind wiederum die kurzen DNA-Stränge, die sich mittels Basenpaarung zum Nanopartikel zusammenlagern (siehe 2.1.6). Im Folgenden wurden die Experimente mit enzymatischer Anlagerung der Fluorochrome durchgeführt, um so eine Abspaltung durch FCS und folgender mitochondrialer Einlagerung zu vermeiden. Im Vergleich der einzelnen Bestandteile der Nanopartikel konnte die Aufnahme sowohl der einzelsträngigen DNA Oligonukleotide als auch der Nanopartikel beobachtet werden, die dUTPs wurden hingegen nicht von HeLa-Zellen aufgenommen (Abbildung 3.13).

3 Ergebnisse

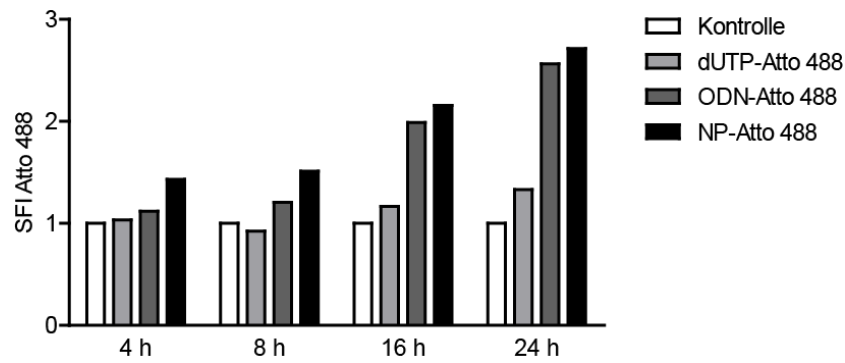


Abbildung 3.13 Vergleichbare Aufnahme von einzelsträngiger DNA und DNA-basierter Nanopartikel. Inkubation von HeLa-Zellen wurden mit Desoxynukleotid-Triphosphat (dUTP), Oligonukleotiden (ODN) oder Nanopartikeln (NP). Diese Moleküle sind angefertigt wie in Material und Methoden beschrieben und kovalent mit dem Fluorochrom Atto 488 markiert. Durchflusszytometrische Bestimmung der Aufnahme über einen Zeitraum von 24 h. Dargestellt ist die spezifische Fluoreszenzintensität (SFI) in einem Versuch. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisübersicht

Die vorliegende Arbeit evaluiert die Verwendung von bifunktionellen ppp-siRNAs, die die Aktivierung des RLR-Rezeptors RIG-I und den *Knock-down* eines onkologischen Zielgens kombinieren, als mögliche neue Therapiestrategie der AML.

Dabei wurde zunächst gezeigt, dass RIG-I und MDA5 in AML-Zelllinien exprimiert werden und der RIG-I-*like* Helikase-Signalweg in allen untersuchten AML-Zelllinien aktivierbar ist. So führte die Stimulation mit den Liganden 5'-Triphosphat-RNA und poly(I:C) in allen AML-Zelllinien zur Induktion von IP-10, der transkriptionellen Hochregulation in einer *feed-forward* Stimulierung von RIG-I und MDA-5 und der Induktion von Zelltod, der zumindest in Teilen über Apoptose vermittelt ist. Dabei zeigte sich jedoch erhebliche Varianz zwischen den Zelllinien bezüglich basaler Expression von RIG-I und MDA5 und der ppp-RNA induzierten Menge an Zytokinen und Zelltod.

In der Arbeit wurden sodann siRNAs gegen folgende acht AML-relevante Zielgene evaluiert: *BRD4*, *FLT3*, *PLK1*, *WT1*, *MCL1*, *CDX2*, *NPM1* und *AML1-ETO*. Dabei zeigte sich erhebliche Varianz in der Transfizierbarkeit, *Knock-down* Effizienz und dem durch *on-target* und *off-target* Effekten induzierten Zelltod zwischen den untersuchten fünf AML Zelllinien. Auch wenn die Unterschiede in den *on-target* Effekten der untersuchten siRNAs in Teilen durch die bekannten Mutationen in den untersuchten AML-Zelllinien erklärt werden konnte, machte dieser Screen deutlich, dass die effektivste siRNA für jede AML-Zelllinie individuell und experimentell bestimmt werden muss. Aus diesem siRNA-Screen wurden die Zielgene *BRD4* und *FLT3* als geeignet ausgewählt, um sie für den kombinierten Ansatz mit der Aktivierung von RIG-I auszutesten. Zunächst erfolgte dies mithilfe der simultanen Transfektion einer bekanntermaßen aktiven 5'-Triphosphat-RNA ohne Zieltarget und einer siRNA, entweder gegen *BRD4* oder gegen *FLT3* (siehe Abschnitt 3.3.1). Dabei zeigte sich bei weitgehend erhaltenen Funktionen beider Einzelmoleküle additive Effekte bei der Reduktion der Zellviabilität, am ausgeprägtesten in den Zelllinien Kasumi-1 und OCI-AML3. Auch die dann untersuchte Kombination von *Knock-down* Funktionalität und RLR-Stimulation in einem RNA-Molekül, einer bifunktionellen siRNA, zeigt diese additiven Effekte auf die Reduktion der Zellviabilität (siehe Abschnitt 3.3.2), vergleichbar mit der simultanen Transfektion beider Moleküle.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von RIG-I-Aktivierung und spezifischem Gen-*Knock-down* in AML-Zelllinien die Möglichkeit bietet bei dieser molekular- und zytogenetisch sehr variablen Erkrankung eine neuartige personalisierte Therapieoption zu entwickeln. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe dieses Thema von Eva Heuer und Micheal Ruzicka weitergeführt und in einem Mausmodell der AML bestätigte sich ein positiver Therapieeffekt einer Behandlung mit 5'-Triphosphat-RNA. Hierbei führte die Behandlung mit ppp-RNA zu einem verlängerten Überleben und bei einigen Mäusen zum T-Zell-mediierten Abstoßen der Tumore. Da die therapeutische Anwendung *in vivo* von unkomplexierten Nukleinsäuren unge löste Probleme bezüglich Stabilität, gewebspezifischer Anreicherung und Transport beziehungsweise Aufnahme in das Zytoplasma im Zielgewebe aufwirft (siehe 4.5), bedarf es neuer Strategien zur Verpackung und zum zielgerichteten Transport dieser Moleküle. Daher wurde in dieser Arbeit ein Lösungsansatz mithilfe von DNA-basierten Nanopartikel untersucht, welche zusätzlich zur spezifischen Aufnahme mit Folatrezeptor-Liganden versehen waren. Die in dieser Arbeit untersuchten Nanopartikel wurden von Samet Kocabey (AG Liedl, LMU München) wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben hergestellt. Die Nanopartikel führten in HeLa-Zellen zwar zu einer endosomale Aufnahme, eine zytoplasmatische Freisetzung von DNA-Nanopartikel oder angehängtem siRNA-*cargo* war jedoch weder mit noch ohne Folat auf der Oberfläche des Partikels zu erreichen. Dementsprechend zeigte sich auch kein *Knock-down*-Effekt durch eine, an den Nanopartikel gebundenen siRNA (siehe Abschnitt 3.4.2). In Zusammenschau dieser Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass diese DNA-basierten Nanopartikel endosomal aufgenommen werden, die zu transportierende siRNA allerdings nicht das Zytoplasma erreicht und auch eine Modifikation mit Folat-Liganden zu keiner Änderung in Quantität oder Lokalisation der aufgenommenen DNA-Nanopartikel führt.

4.2 RLR als therapeutische Zielstruktur

4.2.1 RLR als Zielstrukturen einer Tumorummuntherapie

Da die erfolgreiche Reaktion des Immunsystems auf eine Virus-infizierte Zelle sowie auf eine Tumorzelle entscheidende Gemeinsamkeiten aufweist (beispielsweise IFN und zytotoxische T-Zellen), liegt die Überlegung nahe sich diesen Mechanismus zu Nutzen zu machen und das Auslösen einer anti-viralen Immunantwort mithilfe der passenden PAMPs in der Tumorummuntherapie anzuwenden.

Wie unter Abschnitt 1.2 beschrieben induziert die Stimulation von RLR die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN- α , IFN- β , IP-10 und pro-IL-1 β [28-32], was wiederum eine weitere Aktivierung des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems zur Folge hat. Dabei werden RLR-Liganden auch von spezialisierten Zellen des Immunsystems, vor allem von dendritischen Zellen, erkannt, was die Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und von NK-Zellen fördert. Zudem führt die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen zur Rekrutierung und Aktivierung von T-Effektorzellen. Es konnte beispielsweise in Zellen des Ovarialkarzinoms gezeigt werden, dass die Aktivierung des RLR MDA-5 zur vermehrten Expression von HLA Klasse I, Ausschüttung von Zytokinen wie IP-10 und IFN- α , Apoptose der Tumorzellen, zur DC-Aktivierung und letztendlich zur IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen führt [172]. Interferone sind neben dem angeborenen Immunsystem auch für das adaptive Immunsystem von großer Bedeutung. Sie sind unter anderem für das T-Zell-Überleben und deren klonale Expansion nach Antigenpräsentation erforderlich [173-175]. Auch führt RIG-I Aktivierung in Tumorzellen zur gesteigerten Phagozytose der betroffenen Tumorzelle durch APCs, wie Makrophagen und DCs, wodurch vermehrt Antigene präsentiert werden können [40]. Zur gleichen Zeit sind Typ-I Interferone in der Lage die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexen (*major histocompatibility complex*, MHC) und kostimulatorischen Molekülen zu steigern und dadurch Effektor-T-Zellen zur Differenzierung anregen [176, 177]. So kann über die Aktivierung von RLR die zytolytische Aktivität von T-Zellen verstärkt werden [173, 178]. Außerdem sind Typ-I Interferone von zentraler Bedeutung, sowohl für die B-Zell-Differenzierung und Antikörperproduktion [179, 180], als auch für die Erleichterung der Antigenpräsentation [181].

Somit löst die Aktivierung von RLR eine komplexe und vielfältige Signalkaskade aus, welche das Immunsystem zu einer Tumor-spezifischen Immunantwort lenkt.

Auch ist bekannt, dass die Aktivierung von Interferongen durch Chemo- oder Strahlentherapie mit einem guten Outcome assoziiert ist [182-188], sodass die RLR-Stimulation mit konsekutiver IFN-Ausschüttung während dieser Therapien einen weiteren Vorteil bieten kann. Des Weiteren ist für IFN- α ein direkter inhibitorischer Effekt auf Leukämische Zellen beschrieben [189-191], weswegen dieses Zytokin auch in der Behandlung von AML bei Induktions-, Postremissions- und Rezidivtherapie nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) eingesetzt wurde [191]. Allerdings konnten frühe klinische Studien keinen Vorteil dieser Therapie beweisen [189, 191].

Andere Daten konnten jedoch zeigen, dass in AML gleichbleibende Spiegel von IFN- α wichtig für den antileukämischen Effekt sind [192]. Daher kann man für den ausbleibenden Therapieerfolg in älteren Studien als Grund die intermittierenden Gaben von IFN- α in Betracht ziehen [189]. Da mit PEGyliertem (Polyethylenglycol, PEG) IFN- α nun die Möglichkeit besteht die renale Clearance zu verzögern und so gleichmäßigere Serumspiegel zu erreichen, könnte auch die Therapie der AML mit IFN- α wieder in Betracht gezogen werden [191].

Ein weiteres Zytokin, welches durch die NF- κ B-Signalkaskade nach RLR-Aktivierung produziert wird, ist pro-IL-1 β [30]. Dieses wird durch das Enzym Caspase-1, welches wiederum durch die Formation eines Inflammasomkomplexes aktiviert wird, proteolytisch prozessiert und dadurch biologisch aktiv. Es konnte gezeigt werden, dass RIG-I-Aktivierung auch zur Inflammasom-abhängigen Aktivierung der Caspase-1 führen kann [193] und somit eine weitere Funktion in der Regulierung der Inflammation innehat.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AML-Zellen funktionell intakte RLR exprimieren, welche nach Stimulation die Hochregulation von RLR induzieren und darüber hinaus die Expression und Sekretion des Chemokins IP-10 einleiten, was ein proinflammatorisches Mikromilieu zur Folge hat.

Weitere Arbeiten der Gruppe konnten bereits den therapeutischen Effekt einer 5'-Triphosphat-RNA im syngenesischen C1498 AML Mausmodell zeigen. Hier führte die Aktivierung von RLR zu einer Reduktion der Tumormasse und konnte in einem Teil der Tiere eine komplette Remission mit konsekutiver Bildung eines immunologischen Gedächtnisses induzieren. Diese Beobachtung war abhängig von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen und benötigte einen intakten Typ I Interferon Signalweg (Ruzicka et al., in Bearbeitung).

4.2.2 Aktivierung von RLR als Auslöser von Zelltod

Nachgewiesen werden konnte, dass die Stimulierung von RLR eine Signalkaskade aktiviert, die zur Produktion von Interferonen, sowie *interferon-stimulierten Genen* (ISGs) führt und dadurch direkt oder indirekt Zelltod auslösen beziehungsweise Apoptosemechanismen modulieren können [194-197]. Zusätzlich wurde beschrieben, dass Zelltod Interferon-unabhängig durch die Aktivierung von MAVS und IRF3 in Abhängigkeit von Caspase-3 ausgelöst werden kann [36, 198-206]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass in Zellen des Ovarialkarzinoms durch RLR-Aktivierung eine

immunologisch aktive Form des Zelltodes induziert werden kann, sodass diese Tumorzellen nach RLR-induzierter Apoptose von Phagozyten aufgenommen werden, welche daraufhin *Human Leukocyte Antigen* (HLA) Klasse-I hochregulieren und pro-inflammatorische Zytokine ausschütten [207]. Die Induktion von Apoptose, entweder durch RLR-Liganden oder einen nicht mehr replizierungsfähigen Virus (wie *Hemagglutinating virus of Japan Envelope*, HVJ-E, auch bekannt als replizierungsinkompetente Variante des Sendai-Virus), wurde in einer Vielzahl von Tumorzellentitäten nachgewiesen [65, 67, 122, 207-211]. Die hier vorgelegte Arbeit zeigt, dass es durch die Aktivierung von RLR auch in AML-Zellen zur Apoptose-Induktion sowie zur Reduktion der Zellviabilität kommt (siehe Abschnitt 3.1). Es gibt zudem Evidenz, dass Tumorzellen empfindlicher gegenüber einer Rig-I-induzierten Apoptose sind als nicht neoplastisch-transformierte Zellen. Dies wird über die Proteine der pro-apoptotischen Bcl-2 Familie *p53 upregulated modulator of apoptosis* (Puma) und Noxa vermittelt. Wie Besch et al. in Melanomzellen zeigen konnten, findet die Auslösung dieser Apoptose besonders in malignen Zellen statt, da nicht maligne Zellen durch das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L geschützt sind [36]. Ebenso führte die RLR-Aktivierung im Panc02 Mausmodell mithilfe einer bifunktionellen 5'-Triphosphat-siRNA gegen *Tgf-β₁* hauptsächlich in Zellen des Pankreaskarzinoms zur Apoptose, während normales Gewebe wie auch nicht malignes Pankreasgewebe keine histopathologischen Auffälligkeiten aufwies [67]. Diese Daten lassen darauf schließen, dass neoplastisch veränderte Zellen sensibler für die RLR-vermittelte Apoptose sind, sodass die Stimulation von RLR in malignen Zellen die Möglichkeit einer selektiven anti-kanzerogenen Aktivität bietet.

4.2.3 RIG-I in der zellulären Entwicklung hämatopoetischen Zellen

RIG-I wurde ursprünglich identifiziert in Zellen der Akuten Promyelozytenleukämie (APL) als Mediator der Differenzierung von Granulozyten nach Gabe von all-trans-Retinsäure (*all-trans-retinoic acid*, ATRA) [9, 10]. So verwundert es nicht, dass für RIG-I neben der viel untersuchten Rolle als PRR in der Abwehr von virusinfizierten Zellen auch weitere Funktionen in der zellulären Entwicklung beschrieben wurden. Wie Zhang et al. zeigen konnten, verfügt der Rezeptor über eine regulatorische Funktion, mit der er die Generation und Differenzierung von Granulozyten moduliert [42]. Hierbei konnte beobachtet werden, dass es einerseits zu einer RIG-I-Induktion während der durch RA-ausgelösten Differenzierung von AML kommt, und andererseits diese Induktion auch während der normalen Hämatopoese stattfindet. Außerdem führt der

intrinsische Defekt in *Rig-I*^{-/-} myeloischen Zellen *in vivo* zu einer myeloproliferativen Neoplasie. Als zugrundeliegender Mechanismus wird hierbei die durch Rig-I ausgelöste verminderte Expression des *interferon consensus sequence binding protein* (Icsbp, auch bekannt als Irf8), einem Transkriptionsfaktor zur Regulierung der Differenzierung in myeloischen Zellen, beschrieben. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass RIG-I in hämatopoetischen Zellen die Expression von vielen ISGs initiiert und so die Proliferation von AML-Zellen inhibiert [44]. Ferner konnte für das hepatozelluläre Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) ermittelt werden, dass RIG-I durch Aktivierung von STAT1 in der Expression von ISGs resultiert und so Karzinogenese und Tumormprogression begrenzt [45]. Allerdings konnte in Brustkrebszellen der Nachweis erbracht werden, dass RIG-I einen STAT-1-abhängigen Signalweg triggert und so zur Therapieresistenz und zur Zellexpansion führt [212]. Li et al. beobachteten außerdem, dass RIG-I den AKT-mTOR-Signalweg (Proteinkinase B, PKB oder AKT; *mechanistic target of rapamycin*, mTOR) inhibiert, sodass sowohl die Proliferation von myeloiden Vorläuferzellen als auch die *in vivo* Repopularisierungskapazität von AML-Zellen gehemmt ist [43]. Während die Arbeit von Besch et al. den Nachweis erbrachte, dass RIG-I die Apoptose durch Aktivierung von IPS-1 und Caspasen initiiert [36], konnte somit gezeigt werden, dass schon alleine die Induktion von RIG-I Zelltod über einen Apoptose-unabhängigen Signalweg auslöst, indem es zur Inhibition des AKT-mTOR-Signalwegs sowie zur Initiierung von Autophagie kommt.

Da RIG-I neben der Initiierung einer antiviralen Immunantwort von zentraler Bedeutung in der Regulation der zellulären Entwicklung ist, indem er in Leukämiezellen sowohl die Proliferation inhibiert als auch die Granulopoese aktiviert, bietet die Einbeziehung dieses Rezeptors in eine mögliche antileukämische Therapie eine vielversprechende Option.

Eine Therapiestrategie die sich RLR-Stimulation zur Tumorthherapie der AML zu Nutze macht, bietet basierend auf den aufgeführten experimentellen Befunden der Literatur also einige Vorteilen: (1) Induktion eines proinflammatorischen Milieus mit Aktivierung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems, (2) gesteigerte Immunogenität der AML-Zellen und dadurch Steuerung der Immunantwort direkt auf die Tumorzellen, (3) RIG-I-abhängige Inhibition der Proliferation in AML, (4) IFN-abhängige und -unabhängige Apoptoseinduktion, (5) Vulnerabilität von Tumorzellen gegenüber RLR-induzierter Apoptose verglichen mit normalen Zellen, (6) antileukämischer Effekt durch Inhibition der Proliferation und Aktivierung der Granulopoese.

Auch nach vielen Jahren intensiver Forschung sind die diversen Funktionen von RLR noch nicht vollständig geklärt. Verglichen mit ihrer Aufgabe als zytoplasmatischer Sensor viraler RNA, sind die Mechanismen und die Funktionen einiger anderer Eigenschaften noch wenig bekannt und bieten Raum für weitere Forschungsfelder.

4.3 Evaluation der Zielgene der verschiedenen siRNA-Moleküle

RNA-Interferenz ist ein Prozess, bei dem mithilfe einer siRNA eine sequenzspezifische Degradation der dazugehörigen mRNA initiiert werden kann [49, 213]. Seit der Entdeckung dieses Mechanismus hat sich diese spezifische Möglichkeit zur Stilllegung von Genen etabliert, sowohl in der experimentellen Forschung als auch in der Entwicklung neuer Medikamente. Erhebliche Fortschritte konnten dabei in diversen Bereichen der personalisierten Therapie gemacht werden, wie beispielsweise bei der Behandlung von Tumoren [214], Leukämien [215], Erkrankungen mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) [216], HIV-Infektionen [217], Makulardegeneration [218] sowie genetischen Erkrankungen [219]. Anzumerken ist dabei, dass 2018 erstmals ein Medikament (Patisyran) von der Europäischen Arzneimittel-Agentur als Therapeutikum zugelassen wurde, welches sich den Mechanismus der RNAi zu Nutze macht. Es handelt sich um eine siRNA, welche die Produktion von Transthyretin inhibiert und zur Therapie der hereditären Transthyretin-Amyloidose mit Polyneuropathie zugelassen ist [220]. Diese RNAi-basierte Therapie bringt einige potentielle Vorteile mit sich, so besteht prinzipiell die Möglichkeit jedes Zielgen auszuwählen und der Designprozess ist relativ einfach zu gestalten. Andere Methoden zur Repression eines bestimmten Proteins, wie *small molecules* oder Antikörper-basierte Techniken, beruhen auf dem Prinzip, dass ein bereits exprimiertes Protein inhibiert oder auch degradiert wird. Im Gegensatz dazu greifen RNA-basierte Methoden bereits vor der Translation ein und verhindern so die Expression des Proteins. Mit dem Gebrauch von kurzen RNA-Molekülen als therapeutischer Ansatz sind auch einige Probleme verbunden (siehe Abschnitt 4.5), wie die schnelle renale Exkretion, die Instabilität im Blutkreislauf, geringe zelluläre Aufnahme und die erforderliche zytoplasmatische Freisetzung.

Bei der AML handelt es sich um eine aus genetischer Sicht sehr heterogene Erkrankung, sodass eine Vielzahl an zytogenetischen und molekulargenetischen Mutationen betroffen sein können [74, 221], die mit diversen zellulären Prozessen interferieren. Die RNAi bietet hierfür einen optimalen Ansatz, um eine zielgerichtete und

personalisierte Therapie zu ermöglichen. Dies haben sich schon diverse Studien zunutze gemacht und unterschiedliche potentielle Targets zur Therapie der Leukämie evaluiert (zusammengefasst von Landry et al. [215]). Die in dieser Arbeit ausgewählten Zielgene sind in diversen zellulären Abläufen beteiligt, die das onkogene Potenzial der Leukämiezellen maßgeblich beeinflussen. So wurden beispielsweise siRNAs gegen die Zielgene generiert, die in das Tyrosinkinase-Signaling eingreifen (FLT3), die Transkription (*WT1*, *BRD4*), die Apoptose (*MCL1*), die Hämatopoese (*CDX2*) oder die Mitose (*PLK1*) beeinflussen oder aber als häufige Mutation in AML bekannt sind (*FLT3*, *AML1-ETO*, *NPM1*).

4.3.1 BRD4

Bei BRD4 handelt es sich um ein Protein der BET-Familie, welches die Transkription beeinflusst, indem es Histone azetyliert und so eine essentielle Rolle in Zellwachstum und Zellzykluskontrolle spielt [222]. Zuber et al. konnte anhand eines *in vivo* Mausmodells zeigen, dass dieses Gen essenziell für Wachstum, Progression und Differenzierung in AML ist [127], bis dato war seine Bedeutsamkeit für Leukämie nicht beschrieben. Zuber et al. beschreiben außerdem nach BRD4-Inhibition eine verminderte Proliferation in einigen AML-Zelllinien, so auch in Kasumi-1 und THP-1. Wie in Abschnitt 3.2.1 der vorliegenden Arbeit gezeigt, konnte durch die spezifische *BRD4*-Inhibition in zwei von fünf AML-Zelllinien, Kasumi-1 und OCI-AML3, eine Reduktion der Zellviabilität nachgewiesen werden, jedoch nicht in THP-1. Welche zellulären Mechanismen diese Zelllinien besonders anfällig für dieses Target machen bleibt fraglich. Neueste Daten belegen, dass der selektive *Knock-down* von *BRD4* durch eine siRNA die myeloide Differenzierung induziert und Apoptose in AML-Zellen auslöst, dies sowohl in einer AML-Zelllinie als auch in primären humanen AML-Zellen [223]. Seit der Entdeckung von BRD4 als möglichem Target einer zielgerichteten Therapie der AML sind BET-Inhibitoren rasch in den Fokus klinischer Forschung gerückt [224]. Während diese Studie vielversprechende Ergebnisse für eine etwaige Therapiestrategie mit BET-Inhibitoren vorbringen kann, zeigt sie allerdings auch das Problem der Toxizität auf. Ein weiteres Problem stellt hierbei die schnelle Entwicklung von Resistenzmechanismen dar [225, 226]. Um teils dieses Risiko zu minimieren und teils die Toxizität zu verringern, wurde bereits die Möglichkeit einer Kombinationstherapie mit vielversprechenden Ergebnissen getestet, einmal durch das Zusammenspiel von BRD4-Inhibition mit FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren [227] und einmal mit *Disruptor of telomeric*

silencing 1-like (DOT1L) -Inhibitoren [228]. Die Daten dieser Arbeit favorisieren zudem die Kombination von *BRD4*-spezifischer siRNA mit der immunstimulatorischen RNA gegenüber dem alleinigen *Knock-down* im Hinblick auf eine vermehrte Reduktion der Zellviabilität (siehe Abschnitt 3.3). Allerdings bleibt trotz intensiver Forschung der letzten Jahre der genaue Mechanismus des therapeutischen Effekts in der AML durch eine Inhibition von *BRD4* unklar [229].

4.3.2 FLT3

FLT3 ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der von großer Bedeutung in der Proliferation und der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen ist. Eine Mutation in diesem Gen kann zu einem konstitutiv aktiven Enzym führen, was eine der häufigsten molekularen Alterationen der AML darstellt und außerdem mit einem schlechten klinischen *Outcome* und einer erhöhten Rezidivrate einhergeht [129, 130]. Die Veränderung in diesem Gen kann über zwei Wege geschehen, entweder durch eine FLT/ITD im oder nahe der juxtamembranen Region des Rezeptors oder aber durch eine Punktmutation und konsekutivem Austausch einer Aminosäure im Aktivierungsloop der Domäne der Tyrosinkinase [131, 230]. FLT3 ist das Ziel intensiver Forschung und klinischer Studien in den letzten Jahren, sodass eine Vielzahl an Tyrosinkinase-Inhibitoren in AML Patienten als Monotherapie oder auch in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika getestet wurden [231]. Nichtsdestotrotz ist ein bedeutendes Problem dieser Therapie, die schnelle Resistenzentwicklung [232], die meist auf eine Punktmutation in der Adenosintriphosphat (ATP)-bindenden Region zurück zu führen ist [233, 234], oder aber durch parallele Hochregulation von überlebensnotwendigen Signalwegen zustande kommt [235, 236]. Deshalb wurde in einigen Studien mit vielversprechenden Ergebnissen die Kombination von FLT3-Inhibitoren und anderen Molekülen getestet, sodass gleichzeitig verschiedene Signalkaskaden als Zielstrukturen dienten [237, 238]. Auch einige siRNAs gegen *FLT3* konnten schon erfolgreich *in vitro* und *in vivo* getestet werden [239-241]. Eine siRNA würde zudem den Vorteil mit sich bringen, dass die rasche Resistenzentwicklung durch eine Punktmutation in der ATP-bindenden Region umgangen werden könnte. Wang et al. zeigten beispielsweise in THP-1-Zellen *in vitro* und in einem THP-1 Xenograft-Mausmodell einen Arrest in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus sowie verminderte Proliferation und Apoptose-Induktion nach *FLT3-Knock-down* [241]. Bei THP-1 handelt sich um eine Zelllinie, welche Wildtyp-FLT3 exprimiert, sodass hiermit die Bedeutung von FLT3 auch in nicht mutierten

AML-Zellen hervorgehoben werden kann. In dieser Arbeit konnte eine Reduktion der Viabilität vor allem in den Zelllinien Kasumi-1, MV4-11 und PL-21 gesehen werden (siehe 3.2.2). Während MV4-11 und PL-21 eine FLT3-Mutation tragen, exprimiert Kasumi-1 Wildtyp-FLT3. Allerdings zeigte hier die Zelllinie THP-1 keinerlei Effekte bezüglich Apoptose-Induktion oder Reduktion der Zellviabilität, was in Diskrepanz zu dem oben zitierten Paper von Wang et al. steht. Dort wurde allerdings eine andere Transfektionsreagenz sowie einen Mix aus drei verschiedenen siRNAs verwendeten, was eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bietet.

Wegen der bedeutenden Relevanz von FLT3 auf Prognose und Therapie der AML wird dieses Zielgen weiterhin Gegenstand aktueller Forschung bleiben.

4.3.3 AML1-ETO

t(8;21) ist eine häufige chromosomale Translokation in AML, wobei es zu einem Fusionsgen von *AML1* (auch bekannt als *RUNX1*) auf Chromosom 21 und *ETO* (auch bekannt als *RUNX1T1*) auf Chromosom 8 kommt [133-135]. AML1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung in hämatopoetischen Stammzellen reguliert. ETO gehört zur Gruppe der transkriptionellen Regulatoren, welche über Rekrutierung von Co-Repressoren am Chromatin-Remodelling beteiligt ist. Das Fusionsgen *AML1-ETO* kann ebenso wie AML1 als transkriptioneller Aktivator fungieren und so die Differenzierung blockieren sowie die Selbsterneuerung fördern [136]. Diese Mutation ist als initiiierendes Ereignis der Leukämie anzusehen und kann lange vor dem Ausbrechen der Erkrankung im Blut nachgewiesen werden [242], allerdings ist diese Mutation nicht ausreichend um Leukämogenese zu generieren und benötigt dazu noch weitere Mutationen [243]. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass nach gescheiterter Therapie überlebende AML1-ETO-positive Zellen vulnerabel für weitere Mutationen sind und diese wiederum zu einem Rezidiv führen können [244]. Ptasinska et al. konnte mittels einer siRNA-vermittelten Depletion von *AML1-ETO* in AML-Zellen beobachten, dass dies sowohl in einer Inhibition der Proliferation und der Selbsterneuerung als auch in einer Induktion der Differenzierung resultiert [245]. Die hierfür verwendeten Zellen waren die Zelllinien Kasumi-1 und SKNO-1, sowie primäre humane AML-Zellen. Diese Beobachtung konnte hier bestätigt werden, da der spezifische *Knock-down* nur in der AML1-ETO-positiven Zelllinie Kasumi-1 eine Reduktion der Zellviabilität bewirkte sowie eine geringe Induktion der Apoptose (siehe 3.2.3). Dabei ist es möglich, dass die beobachtete verringerte Zellviabilität, beziehungsweise der dafür gemessene,

verminderte metabolische Umsatz zum Großteil nicht auf eine Induktion der Apoptose, sondern auf eine Inhibition der Proliferation zurückzuführen ist, wie sie Ptasinska und Kollegen ebenfalls beschrieben haben.

4.3.4 PLK1

PLK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die verschiedene entscheidende Schritte während der Mitose reguliert [137]. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass PLK1 nur auf einem sehr niedrigen Niveau in normalem Gewebe exprimiert wird, in einer großen Anzahl an Tumoren jedoch überexprimiert wird (zusammengefasst in [246]), so auch in AML-Zellen [138]. Die PLK1-Inhibition führt in AML-Zellen zur verminderten Proliferation, einhergehend mit einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase und der Apoptose-Induktion [139]. Normale primäre hämatopoetische Vorläuferzellen zeigen sich weitgehend unempfindlich gegenüber dieser Inhibition [138]. Diese Effekte der *PLK1*-Inhibition konnte mit dieser Arbeit bestätigt werden, sodass in allen untersuchten AML-Zelllinien ebenfalls eine Apoptose-Induktion und eine verminderte Viabilität beobachtet werden konnten (siehe 3.2.4). Aktuell befinden sich einige niedermolekulare Inhibitoren in der präklinischen und klinischen Entwicklung und zeigen hier vielversprechende therapeutische Ergebnisse [246]. Interessanterweise konnten Vitour et al. eine bis dato unbekannte weitere Funktion von PLK1 in der MAVS-abhängigen Regulation der IFN-Induktion beschreiben [247]. PLK1 interagiert mit MAVS und reguliert hiermit dessen Aktivität, sodass in den Signalweg der IFN-Induktion eingegriffen wird und es zu einer Hemmung der IFN-Ausschüttung kommt.

4.3.5 WT1

WT1 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der essentiell für Zelldifferenzierung und Zellwachstum ist [140]. Für die AML sind verschiedene genetischen Veränderungen von WT1 beschrieben, welche klinisch mit einer höheren Rezidivrate und einem schlechteren Gesamtüberleben korrelieren [145-147]. Interessanterweise ist für WT1 in AML sowohl eine Überexpression bekannt [141-143], als auch unterschiedliche somatische Mutationen, welche zu einem Funktionsverlust oder zu einer fehlenden Expression führen [144, 248]. Arbeiten anderer Gruppen konnten zeigen, dass die Inhibition der WT1-Expression in myeloischer Leukämie zur Apoptoseinduktion und zu einem verminderten Leukämiewachstum führt [148-150]. Dabei beobachteten Ito et al.,

dass der siRNA-induzierte *Knock-down* von *WT1* in drei AML-Zelllinien (K546, HL-60 und Kasumi-1) Apoptose induziert, vermittelt über Caspase-3 und -9 Aktivierung sowie das proapoptotische Protein Bax [149]. In Übereinstimmung damit zeigten auch andere Arbeiten eine RNAi-vermittelte *WT1*-spezifische Reduktion des Überlebens sowie eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika in den Zelllinien KG-1, MV4-11 und Kasumi-1 [249]. Analog hierzu stellen die Daten dieser Arbeit eine Reduktion der Zellviabilität dar, vor allem in den Zelllinien OCI-AML3 und MV4-11, aber auch in Kasmui-1 (siehe 3.2.5). Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass die Effizienz des *Knock-downs* mit zwei unterschiedlichen *WT-1*-spezifischen siRNA nur gering ausfiel. Neben der Funktion von *WT1* als Transkriptionsfaktor konnte eine weitere Rolle in der epigenetischen Modifikation nachgewiesen werden, allerdings bleiben die genauen molekularen Mechanismen und Funktionen dieses Proteins in der Leukämogenese noch im Unklaren [250].

4.3.6 MCL1

Das *MCL1*-Gen kodiert für ein Protein der BCL2-Familie, welches bei der Regulation der Apoptose von Bedeutung ist [151]. *MCL1* ist essentiell für die embryonale Entwicklung [152] und für das Überleben unterschiedlicher Zellen, wie hämatopoetischer Stammzellen [153], Lymphozyten [154], neutrophiler Granulozyten [155] oder Neuronen [156]. Darüber hinaus ist *MCL1* in verschiedenen Tumoren verstärkt exprimiert [157]. Arbeiten anderer Gruppen konnten zeigen, dass dieses Protein sowohl essentiell für die Entwicklung und das Überleben von AML-Zellen ist [158], als auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Medikamenten spielt [159]. *MCL1* stellt eine vielversprechende Zielstruktur zur Therapie der AML dar (zusammengefasst von Bose und Grant) [251] und auch zur *MCL1*-Inhibition durch RNAi gibt es erfolgversprechende Daten. So führte dies beispielsweise in der AML-Zelllinie HL-60 zu einer Inhibition des Überlebens und der Proliferation sowie zur Apoptose [252]. Auch konnte gezeigt werden, dass *MCL1* ein entscheidender Effektor der FLT3-ITD-vermittelten Therapieresistenz ist und der *MCL1*-spezifische *Knock-down* die Zellen sensitiver für einer Therapie macht [253]. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche *MCL1*-spezifischen siRNAs untersucht, jedoch zeigte keine davon eine suffiziente Reduktion der Expression (siehe 3.2.6). Die Zellviabilität war nichtsdestotrotz leicht reduziert, in OCI-AML3-Zellen allerdings in großem Ausmaß. Dieser ausgeprägte Effekt in dieser Zelllinie lässt sich bei nicht nachweisbarem *Knock-down*

allerding am ehesten durch *off-target*-Effekte erklären. Im Gegensatz zu den hier verwendeten Methoden, wurden bei den oben zitierten Publikationen entweder murine Modelle beziehungsweise primäre humane AML-Zellen untersucht [253] oder im humanen *in vitro* Setting mit anderen AML-Zelllinien (HL-60) und Transfektionsmethoden (Lipofectamin 2000 anstatt RNAiMAX, beides Invitrogen) [252] gearbeitet.

4.3.7 CDX2

Das *CDX2*-Gen ist ein Mitglied der *caudal-related homeobox*-Familie, welche bei der Embryogenese [162] und der Hämatopoese [163] eine wichtige Rolle spielen. Während *CDX2* in gesunden adulten hämatopoetischen Zellen nicht exprimiert wird, ist es in einem Großteil der Patienten mit AML nachweisbar [164]. Wie Arbeiten anderer Gruppen zeigen konnten, führt einerseits eine verminderte *CDX2*-Expression zur Inhibition der Proliferation in AML-Zelllinien und andererseits begünstigt eine aberrante *CDX2*-Expression die Selbsterneuerung in primären hämatopoetischen Zellen [164]. Auch spielt im Mausmodell die *Cdx2*-Expression eine entscheidende Rolle bei der Transformation der hämatopoetischen Stammzelle in eine leukämische Stammzelle [254]. In dieser Arbeit konnte allerdings kein Effekt der *CDX2*-spezifischen Inhibition der Expression auf die untersuchten AML-Zelllinien nachgewiesen werden (siehe 3.2.7). Nur in der Zelllinie THP-1 konnte eine Reduktion der *CDX2*-Expression erzielt werden, hier waren jedoch keine zytoreduktive Effekte zu beobachten. Ergebnisse anderer Gruppen zeigten ebenfalls heterogenen Ergebnisse der *Knock-down*-Effizienz in verschiedenen AML-Zelllinien (zwischen 23% und 84% mit der besten von drei getesteten Moleküle), jedoch mithilfe einer *short hairpin* RNA (shRNA) [164]. Publikationen zur Reduktion der *CDX2*-Expression in AML-Zellen mithilfe einer siRNA liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor. Dem hier fehlenden *Knock-down* könnte somit eine zu geringe Transfektionseffizienz oder auch eine unzulängliche siRNA-Sequenz zu Grunde liegen. Scholl und Kollegen konnten in THP-1-Zellen nach Verringerung der Expression von *CDX2* auf etwa ein Drittel eine Reduktion des Zellwachstums nach fünf Tagen beobachten, auf Apoptoseinduktion oder metabolische Aktivität wird hier nicht Bezug genommen [164]. Der hier fehlende zytoreduktive Effekt in THP-1 nach erfolgreichem *CDX2-Knock-down* bietet mehrere Erklärungsmöglichkeiten. So ist der hier gewählte Beobachtungszeitraum mit 24 Stunden (Apoptoseinduktion) und 48 bis 72 Stunden (Zellviabilität) zu kurz gewählt gewesen als dass die in der Referenzliteratur beschriebenen Effekte zu beobachten gewesen wären. Auch divergieren die *Read-*

outs, sodass eine verminderte *CDX2*-Expression zwar eine Verringerung der Zellzahl zur Folge haben kann, dies aber nicht auf der Induktion von Apoptose beruhen muss und dies ebenso keine verminderte Zellviabilität zur Folge haben muss. Abschließend kann festgehalten werden, dass mit den hier untersuchten *CDX2*-spezifischen siRNAs ein *Knock-down* schwierig zu erzielen war und falls dieser doch erreicht werden konnte, keine Effekte mit den hier verwendeten Analysemethoden zu beobachten waren.

4.3.8 NPM1

NPM1 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, welches eine *Shuttle*-Funktion zwischen Nukleus und Zytoplasma inne hat [165]. Es erfüllt dabei verschiedene Aufgaben beim Zellwachstum und bei der Proliferation, und greift in diverse biologische Prozesse ein, wie der Entstehung von Ribosomen [166], der Embryogenese [167] und der Regulation der Apoptose [168]. Eine Mutation in diesem Gen kommt häufig in AML vor und führt zu einer zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins [169]. Zudem konnten Arbeiten anderer Gruppen im Mausmodell zeigen, dass eine *Npm1*-Mutation zur Initiierung einer AML führt [170]. Jedoch ist eine *NPM1*-Mutation mit einer positiven Prognose unter Therapie in AML-Patienten mit normalem Karyotyp assoziiert [255], während die Co-Expression von FLT-ITD negative Auswirkungen auf das therapeutische Outcome der Patienten hat [256]. Wie Balusu et al. nachweisen konnten führte eine siRNA-vermittelte Inhibition von *NPM1* in OCI-AML3 Zellen zur Induktion der Differenzierung sowie zur Apoptose [257]. Zudem konnte eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber der Therapie mit ATRA und dem Zytostatikum Cytarabin beobachtet werden. Auffällig war außerdem, dass der Effekt einer inhibierten NPM1-Oligomerisierung weniger stark ausgeprägt war bei gleichzeitiger Expression einer FLT3-ITD Mutation. Die Resultate dieser Arbeit stützen diese Beobachtungen, da ein *Knock-down* von *NPM1* zur Reduktion der Zellviabilität vor allem in der *NPM1*-mutationstragenden Zelllinie OCI-AML3 führt, in gewissem Ausmaße ebenso in Kasumi-1 und THP-1 (Zelllinien mit Wildtyp-*NPM1*) (siehe 3.2.8). Die AML-Zelllinien mit *FLT3*-Mutation, MV4-11 und PL-21, zeigten hingegen keinerlei Veränderungen.

4.4 Bifunktionelle siRNA in der Tumorthherapie

Sowohl die Stimulation von RLR (siehe Abschnitt 4.2) als auch die siRNA-vermittelte RNA-Interferenz (siehe 4.3) werden durch kurze synthetische RNA-Moleküle ausgelöst. Bereits 2004 konnten Kim et al. zeigen, dass die bis dato beobachtete Induktion von Typ-I IFN durch siRNA-Moleküle auf eine Herstellung der siRNA mittels T7-Phagenpolymerase zurückzuführen war [258]. Das durch T7 entstandene 5'-Triphosphat war erforderlich für diese IFN-Induktion, während die siRNA-Funktion nicht eingeschränkt war. Die Kombination beider Reaktionen, der Immunstimulation und der RNA-Interferenz, in einer bifunktionellen siRNA ist möglich, da beide Reaktionen im Zytoplasma lokalisiert sind, sowohl die Erkennung durch RIG-I als auch die Integration in den RISC-Komplex. Wie in Abschnitt 1.6 bereits erwähnt, wurde das Prinzip der bifunktionellen 5'-Triphosphat-siRNA bereits in einigen Tumorentitäten mit vielversprechenden Ergebnissen getestet, wie beispielsweise im Melanom [65], im Pankreaskarzinom [67], in Lungentumorzellen [68] und in verschiedenen anderen Tumorzelllinien [69]. Seo et al. beschreibt hingegen die Inhibition der RNAi-Aktivität nach viraler Infektion beziehungsweise nach der Stimulation mit dem RLR-Liganden poly(I:C) [259]. Hierbei wird vermittelt durch die Signalkaskade von RIG/MAVS eine Poly-ADP-Ribosylierung von RISC ausgelöst, mit der Konsequenz, dass dessen Aktivität reduziert war. Welche Relevanz dieser Beobachtung zugeschrieben werden muss bleibt allerdings fraglich, da in den bereits untersuchten bifunktionellen siRNAs [65, 67-69] ein ausreichender *Knock-down* des jeweiligen Zielgens erzielt werden konnte. Auch die in dieser Arbeit untersuchte Kombination von Immunstimulation und RNAi gegen *BRD4* beziehungsweise *FLT3* zeigten in den AML-Zellen keine Reduktion der *Knock-down*-Effizienzen (siehe 3.3). Zudem konnte zumindest bei Verwendung einer 5'-triphosphat-Modifikation an beiden Strängen der siRNA auch mit den bifunktionellen siRNAs weiterhin eine suffiziente Aktivierung von RIG-I nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Reduktion der Zellviabilität zeigten sich additive Effekte, sowohl bei der parallelen Transfektion von 5'-Triphosphat-RNA und siRNA als auch bei der Kombination in einem Molekül, sodass dies ein vielversprechendes Konzept zur personalisierten Therapie der AML bieten kann.

Allerdings könnte bei der Applikation von RIG-I Stimulanz und siRNA in zwei separaten Molekülen eine kostengünstigere und flexiblere Möglichkeit geschaffen werden, verschieden Targets patienten- und mutationsspezifisch zu designen.

Dahingehend bietet die Kombination beider Effekte in einem Molekül, der bifunktionellen siRNA, einerseits den Vorteil, dass nur die Hälfte der Moleküle transportiert werden muss und so einem bedeutenden Problem der Applikation entgegengewirkt werden kann. Andererseits wird mit der bifunktionellen siRNA sichergestellt, dass beide Effekte, RIG-Stimulierung und *Knock-down*, in einer Zelle gleichzeitig stattfinden und es nicht durch eine etwaige unterschiedliche Transfektion der Zellen zu einer ungleichmäßigen Verteilung kommt.

4.5 Zelluläre Aufnahme von DNA-basierten Nanopartikeln

Während der therapeutische Ansatz, sowohl mit RLR-Aktivierung als auch mit RNA-Interferenz, eine Reihe von Vorteilen bietet, ist der systemische Transport nackter Nukleinsäuren durch viele Faktoren erschwert. Bei *in vivo* Applikation kommt es zunächst zu einer Degradation der nicht modifizierten RNA-Moleküle durch Serum-Nukleasen sowie zu einer schnellen systemischen Elimination [260]. Und da es sich bei den kurzen RNA-Strängen um negativ geladene, hydrophile und relativ große Moleküle handelt, können diese die lipophile Zellmembran alleine nicht überwinden [261]. Deshalb wurden eine Reihe von unterschiedlichen Transportmechanismen entwickelt, um diese kurzen RNA-Moleküle zum gewünschten Gewebe beziehungsweise den gewünschten Zellen zu bringen. Dazu gehören beispielsweise Lipid-basierte Nanopartikel [262, 263], polymere Nanopartikel [264], Chimere aus Aptamer und siRNA [265] oder anorganische Nanopartikel [266]. In den letzten Jahren hat zudem die Strategie mit DNA-basierten Nanopartikel (siehe 1.8) vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Hierbei konnten eine Vielzahl an möglichen Strukturen gestaltet werden, wie etwa Tetraeder [110], Oktaeder [111], flache Platten [96, 112], würfelförmige Strukturen [115] oder Röhren [113, 114]. Letztgenannte Form wurde von Samet Kocabey (AG Liedl, LMU München) angefertigt (siehe 2.1.6) und in den Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendet.

Ein Vorteil, der sich durch den Einsatz von modifizierbaren Transportmolekülen ergibt, ist die Möglichkeit zusätzliche Liganden auf ihnen zu platzieren, welche einen zielgerichteten Transport zu den gewünschten Zellen erleichtern. In dieser Arbeit wurde Folat als Ligand gewählt, da der Folatrezeptor in Tumorzellen eine deutliche Überexpression aufweist, bei gleichzeitiger moderater Expression im normalen Gewebe, so dass er eine geeignete Struktur für eine tumorspezifische Anreicherung darstellt [119,

120, 267]. Eine Folat-vermittelte Aufnahme wurde ebenfalls für DNA-basierten Nanopartikel bereits beschrieben [268, 269]. Allerdings konnte in dieser Arbeit mit den DNA-basierten und Folat-gebunden röhrenförmigen Nanopartikeln keine Folat-abhängige Aufnahme in HeLa-Zellen beobachtet werden (siehe 3.4.1). Dennoch kam es zu einer Aufnahme der Nanopartikel in Endosomen der Zelle. Typischerweise werden Nanopartikel *via* Endozytose in die Zellen aufgenommen, respektive ist hier in den meisten Fällen von einer Pinozytose auszugehen [270]. Bei letzterer handelt es sich um eine Rezeptor-unabhängigen Mechanismus, bei dem eine Zelle durch Bildung von Vesikeln unspezifisch Flüssigkeit inklusive darin gelöster Substanzen aus der Umgebung aufnimmt. Die andere Möglichkeit der Aufnahme von Partikeln aus der Umgebung ist die Rezeptor-vermittelten Endozytose, beispielsweise vermittelt durch Folatrezeptoren, diese Funktion kann jedoch auch durch diverse andere Membranrezeptoren vermittelt werden. In beiden Fällen fusionieren diese Vesikel mit den Endosomen. Das Freilassen der aufgenommenen Moleküle aus den Endosomen stellt jedoch ein weiteres entscheidendes Problem beim zielgerichteten Transport mit Nanopartikeln dar, die ihr Cargo in das Zytoplasma abgeben sollen [270, 271]. Die meisten Strategien, die dieses Problem angehen, beruhen auf dem sauren Mikromilieu der Endosomen und dem sogenannten *proton sponge* Effekt. Dabei verhindert die Pufferkapazität die Ansäuerung der Endosomen, was zu einem vermehrten Einstrom von Protonen und infolgedessen auch von Anion führt und letztendlich in dem osmotischen Anschwellen der Endosomen mündet. Es gibt diverse Ansätze, die sich mit dem Freilassen aus den Endosomen befassen, wie beispielsweise kationische Polymere, pH-sensitive Polymere, Kalziumphosphate und zellpenetrierende Peptide (zusammengefasst von Ma [270]). Hingegen finden sich auch etliche Berichte über einen erfolgreichen Transport der Nanopartikel ohne diese Endosomen-spezifischen Strategien [109, 268, 269, 272]. Wie etwa Hong et al., die ebenfalls mit Folat-konjugierte DNA-basierte Nanopartikel zum Transport einer siRNA genutzt haben und daraufhin eine verminderte Genexpression beobachten konnten [268]. Allerdings wurde nicht über die exakte zelluläre Lokalisation der Moleküle berichtet. Beobachtungen von Lee et al. belegen zudem einen zielgerichteten Transport DNA-basierter Nanopartikel mit dem Transfer einer siRNA *in vivo* [109]. Hierbei wurden die Nanopartikel in Form eines Tetraeders hergestellt und mittels DNA-Überhang mit sechs siRNA-Molekülen hybridisiert, welche wiederum zur besseren Serumstabilität mit einer 2'-O-Methylierung (2'-OMe) modifiziert waren. Unter diesen Voraussetzungen konnte beobachtet werden, dass mindestens drei Folat-

Liganden nötig waren, um eine siRNA-Funktion gewährleisten zu können und zudem mussten diese Liganden in der passenden räumlichen Orientierung angeordnet sein. Interessanterweise zeigte sich die zelluläre Aufnahme der Nanopartikel unabhängig von der Lokalisation der Folat-Liganden, allerdings war die Orientierung von mindestens drei Folat-Liganden in räumlicher Nähe nötig für einen erfolgreichen *Knock-down* durch die siRNA. Die zugrundeliegenden Ursachen bleiben allerdings unklar und Lee und Kollegen spekulieren über einen Einfluss auf intrazelluläre Transportsignalwege. Auch bleibt unerwähnt, in welchen zellulären Kompartimenten sich die Nanopartikel, abhängig von ihren Folat-Liganden, befanden. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen ebenfalls eine Aufnahme der Nanopartikel, unabhängig von Folat, allerdings konnte auch mit sechs Folat-Liganden in räumlicher Nähe kein siRNA-induzierter *Knock-down* nachgewiesen werden (siehe 3.4.2). Da der Einbau in den RISC-Komplex zur RNA-Interferenz im Zytoplasma stattfindet und die Nanopartikel zu jedem beobachteten Zeitpunkt endosomal lokalisiert waren, überrascht diese Beobachtung nicht. Es bleibt also fraglich, welche zellulären Mechanismen im Zusammenspiel von RNA-Interferenz und der Anzahl sowie der räumlichen Orientierung der Liganden mitwirken. Ein weiteres Problem bei der Verwendung der DNA-basierten Nanopartikel ist eine verminderte Integrität und Funktion der Strukturen *in vitro* im Zellkulturmedium oder auch bei *in vivo* Bedingungen. Es ist bekannt, dass die Stabilität der DNA-basierten Strukturen durch Bedingungen wie DNase-Aktivität im Serum oder Magnesium-Depletion beeinträchtigt sein kann. Hahn et al. konnte dies für verschiedene DNA-basierte Strukturen, hergestellt mit der Origami-Methode, nachweisen [273]. Dabei führte eine Depletion von Kationen zu einer zeit- und designabhängigen Denaturierung der DNA-Moleküle. Außerdem hatte die Anwesenheit von FCS die Digestion der DNA-Partikel zur Folge und konnte durch Hitzeinaktivierung bei 75 °C und damit verbundener Inaktivierung der Nukleasenaktivität verhindert werden. Auch für den in dieser Dissertation verwendeten Nanopartikel konnte eine Degradierung abhängig von Magnesiumdepletion und FCS nachgewiesen werden [124]. So war der Nanopartikel ohne Erweiterungen stabil bei einer FCS-Konzentration von 10% sowie bis zu einer Magnesiumkonzentration von 1 mM. Allerdings wurden durch strukturelle Modifikationen, wie das Hinzufügen der siRNA, die Nanopartikel schneller degradiert. Diese Tatsache könnte auch dazu beigetragen haben, dass bezüglich der Aufnahme der Nanopartikel sowie des *Knock-downs* keine Folat-Abhängigkeit beobachtet werden konnte. Wie oben beschrieben nutzten Lee et al. eine 2'-Ome zur Verbesserung der siRNA-Stabilität [109],

dieser Modifikation wird ein protektiver Mechanismus gegen 3'-5'-Degradierung und 3'-Uridylierung zugeschrieben [274, 275]. Inwieweit sich diese 2'-Ome auf die Stabilität, der in dieser Arbeit untersuchten Nanopartikel ausgewirkt hätte, wurde hier nicht untersucht. Wie Kocabey et al. zeigen konnte, führte bereits eine Veränderung der Grundbausteine bei der Herstellung der DNA-Nanopartikel zu einer verbesserten Stabilität [124]. Dabei wurden die Länge der Oligonukleotide von 42 auf 84 Basen erhöht. Des Weiteren konnten die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Markierung der DNA-basierten Nanopartikeln mit Atto 647 *via* Hybridisierung (Basenpaarung zwischen zwei DNA-Strängen mittels Wasserstoffbrückenbindung), abhängig von der FCS-Zugabe zum Medium, zu einer starken mitochondrialen Anreicherung des Farbstoffes führte (siehe 3.4.3). Dies wurde auf eine Abspaltung des Fluorochroms durch Serumbestandteile zurückgeführt und konnte durch Ersetzen der Hybridisierung von Atto 647 durch die enzymatische Markierung mit Atto 488 aufgehoben. Da hier gleichzeitig zwei Variablen geändert wurden, die Art der Konjugation sowie die Art des Fluorochroms, kann nicht mit Sicherheit auf einen definitiven Mechanismus geschlossen werden. Naheliegender ist, dass durch die Änderung der chemischen Reaktion die Bindung robuster gegenüber der Serum-abhängigen Spaltung ist. Aber auch Parameter wie die Position oder die unterschiedliche chemische Beschaffenheit des Fluorochroms sind in Betracht zu ziehen.

Die Tatsache der Serum-abhängigen Abspaltung des Fluorochroms und anschließender starker zellulärer Aufnahme muss besonderes Gewicht gegeben werden, da sie schnell zu einer Fehlinterpretation der Daten führen kann. Da die Nanopartikel gebundene siRNA nur mittels komplementärer Basen-Hybridisierung gekoppelt war (siehe 2.1.6), kann ein fehlender *Knock-down* auch durch die Auflösung der Hybridisierung erklärt werden. Allerdings muss diesbezüglich angeführt werden, dass bei der bereits erwähnten Arbeit von Lee et al. die Liganden ebenfalls mittels Hybridisierung angelagert wurden [109]. Es bleibt somit fraglich, welche Mechanismen und strukturellen sowie umgebungsbezogene Veränderungen dies maßgeblich beeinflussen.

Die Aufnahme von ODNs wurde schon von vielen Gruppen untersucht und dabei konnte gezeigt werden, dass diese Moleküle von Zellen aufgenommen werden und daraufhin in endozytotischen Vesikeln akkumulieren [276-279]. Auch die Daten dieser Arbeit stützen diese Beobachtung. So konnte nachgewiesen werden, dass einzelsträngige DNA das gleiche Niveau an Internalisierung in die Zellen aufweist wie DNA-

4 Diskussion

basierten Nanopartikel (siehe 3.4.4). Dies sollte auch für zukünftige Experimente in Betracht gezogen werden, da hier die Gefahr der Fehldeutung der Befunde besteht. Für eine Weiterentwicklung dieser Methodik sollte zunächst die Stabilität verbessert werden und zudem eine Möglichkeit für den Release aus dem endosomalen Kompartiment gefunden werden. Alles in Allem bekräftigen diese Daten, dass weiterhin der Bedarf an präziser Ausarbeitung und Prüfung der Integrität der Nanopartikel besteht, vor allem unter Einbezug der physiologischen zellulären Umgebung.

5 Zusammenfassung

Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) ist ein zytoplasmatischer Sensor für virale RNA. Die Aktivierung dieses Rezeptors initiiert eine Signalkaskade, die in der Produktion von Typ-I Interferonen und der Induktion von Apoptose resultiert. Für immuntherapeutische Ansätze in der Tumorthherapie stellt RIG-I eine vielversprechende Zielstruktur dar, über die durch die Gabe eines spezifischen Liganden für RIG-I in Form einer kurzen 5'-Triphosphat-RNA eine virale Infektion im Tumor imitiert werden kann, die eine tumorspezifische Immunantwort auslöst. Neuartige bifunktionelle ppp-siRNAs versuchen diese RIG-I-vermittelte Aktivierung des Immunsystems mit einer über RNA-Interferenz vermittelten gezielten Genexpressionsinhibition von Onkogenen zu verbinden. Dieses Prinzip wurde bereits mit vielversprechenden Ergebnissen in Tiermodellen von Melanom oder Pankreaskarzinom angewendet. Zur Akuten Myeloischen Leukämie (AML) sind allerdings diesbezüglich bisher keine Daten bekannt, daher fokussiert sich diese Arbeit auf die Evaluation bifunktioneller siRNAs zur Therapie der AML. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine Leukämieform mit schlechter Prognose, insbesondere bei höherem Erkrankungsalter. Mit der Kombination von RIG-I-Aktivierung und spezifischem Gen-*Knock-down* bietet sich bei dieser molekular- und zytogenetisch sehr heterogenen Erkrankung die Möglichkeit einer personalisierbaren Therapieoption.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass die Stimulation von RIG-I mittels prototypischer Liganden in den untersuchten fünf AML-Zelllinien zur Induktion der Expression von RIG-I-like Rezeptoren (RLR), der Expression und Sekretion des Chemokins *interferon gamma-induced protein 10* (IP-10) sowie zur Apoptoseinduktion und Zellviabilitätsreduktion führen. Die Evaluation unterschiedlicher potentieller siRNA-Targets in den verschiedenen AML-Zelllinien zeigte insbesondere für den *Knock-down* von *bromodomain-containing 4* (*BRD4*), *fms-like tyrosine kinase 3* (*FLT3*), *Polo-like kinase 1* (*PLK1*) und Wilms-Tumor-Proteins 1 (*WT1*) einen zytoreduktiven Effekt. Auch der zielgerichtete Einsatz von siRNAs die gegen AML-typische Mutationen in *FLT3*, *acute myeloid leukemia 1/eight-twenty-one* (*AML1-ETO*) und *nucleophosmin 1* (*NPM1*) gerichtet waren, führte in den entsprechenden mutationstragenden Zelllinien zu einer Apoptoseinduktion sowie Viabilitätsreduktion, während sich die AML-Zelllinien ohne die entsprechende Mutation weitgehend resistent zeigten. Aus diesem siRNA-Screen wurden die Zielgene *BRD4* und *FLT3* als geeignet ausgewählt, um sie für einen kombinierten

Ansatz mit der Aktivierung von RIG-I auszutesten. Dabei zeigte sowohl die parallele Transfektion einer bekanntermaßen aktiven 5'-Triphosphat-RNA ohne Zieltarget und siRNAs gegen *BRD4* oder *FLT3* als auch die Verwendung 5'-Triphosphat-modifizierter siRNAs gegen *BRD4* oder *FLT3* additive Effekte bei der Reduktion der Zellviabilität, durch die Kombination von RIG-I-Aktivierung und Gen-Knock-down. Die Funktionen der Einzelkomponenten bezüglich *Knock-down* Funktionalität und RLR-Stimulation blieben dabei in der Kombinationstherapie erhalten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von RIG-I-Aktivierung und spezifischem Gen-*Knock-down* in AML-Zelllinien die Möglichkeit bietet bei dieser molekular- und zytogenetisch sehr variablen Erkrankung eine neuartige personalisierte Therapieoption zu entwickeln.

Da die therapeutische Anwendung *in vivo* von unkomplexierten Nukleinsäuren unge löste Probleme bezüglich Stabilität, gewebspezifischer Anreicherung und Transport bzw. Aufnahme in das Zytoplasma im Zielgewebe aufwirft, bedarf es neuer Strategien zur Verpackung und zum zielgerichteten Transport dieser Moleküle. Daher wurde in dieser Arbeit ein Lösungsansatz mithilfe von DNA-basierten Nanopartikeln untersucht, welche zusätzlich zur spezifischen Aufnahme ins Tumorgewebe mit Folat-Rezeptor-Liganden versehen waren. Die in dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Liedl (LMU München) verwendeten, aus einzelsträngigen DNA-Oligos konstruierten röhrenförmigen DNA-Partikel von 27 nm Länge und 6 nm Durchmesser, führten in HeLa-Zellen zwar zu einer endosomalen Aufnahme, eine zytoplasmatische Freisetzung von DNA-Nanopartikel oder angehängtem siRNA-*cargo* war jedoch weder mit noch ohne Folat auf der Oberfläche des Partikels zu erreichen. Dementsprechend zeigte sich auch kein *Knock-down*-Effekt durch eine, an den Nanopartikel gebundenen siRNA, da diese für ihre Funktion das Zytoplasma erreichen muss. In Zusammenschau dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass die untersuchten DNA-basierten Nanopartikel in ihrer jetzigen Form als Transportträger einer therapeutischen siRNA nicht geeignet sind und einer technischen Weiterentwicklung bezüglich Stabilität und Freisetzung ihres Cargos aus dem Endosom in das Zytoplasma bedürfen um diese Funktion erfüllen zu können.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit RIG-I als therapeutische Zielstruktur in der AML bestätigt, geeignete Zielgene in AML-Zellen für eine siRNA-basierte Therapie identifiziert und ein additiver Effekt der Kombination von RIG-I Aktivierung und Gen-

Knock-down bezüglich der Zelltodinduktion in AML-Zellen gezeigt und damit die Basis für eine therapeutischer Weiterentwicklung dieses Therapieprinzips für die Behandlung der AML gelegt.

6 Literaturverzeichnis

1. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
2. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-40.
3. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in innate immunity and inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(3).
4. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
5. Imaizumi, T., et al., *Interferon-gamma induces retinoic acid-inducible gene-I in endothelial cells*. Endothelium, 2004. **11**(3-4): p. 169-73.
6. Kang, D.C., et al., *mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 637-42.
7. Kang, D.C., et al., *Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene*. Oncogene, 2004. **23**(9): p. 1789-800.
8. Rothenfusser, S., et al., *The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5260-8.
9. Liang, Y., et al., *[Terminal differentiation of human acute promyelocytic leukemia (APL) cells induced by Tanshinone II A in primary culture]*. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2000. **31**(2): p. 207-10.
10. Liu, T.X., et al., *Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells*. Blood, 2000. **96**(4): p. 1496-504.
11. Onoguchi, K., M. Yoneyama, and T. Fujita, *Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(1): p. 27-31.
12. Saito, T., et al., *Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 582-7.
13. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
14. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
15. Schmidt, A., et al., *5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 12067-72.
16. Ablasser, A., et al., *RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1065-72.
17. Gitlin, L., et al., *Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8459-64.
18. Komuro, A. and C.M. Horvath, *RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12332-42.
19. Satoh, T., et al., *LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1512-7.

20. Pollpeter, D., et al., *Impaired cellular responses to cytosolic DNA or infection with Listeria monocytogenes and vaccinia virus in the absence of the murine LGP2 protein*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18842.
21. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 981-8.
22. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1167-72.
23. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. Cell, 2005. **122**(5): p. 669-82.
24. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*. Mol Cell, 2005. **19**(6): p. 727-40.
25. Paz, S., et al., *A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response*. Cell Res, 2011. **21**(6): p. 895-910.
26. Fitzgerald, K.A., et al., *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 491-6.
27. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1148-51.
28. Sen, G.C., *Viruses and interferons*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 255-81.
29. Wathlet, M.G., et al., *Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 507-18.
30. Poeck, H., et al., *Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 63-9.
31. Brownell, J., et al., *Direct, interferon-independent activation of the CXCL10 promoter by NF-kappaB and interferon regulatory factor 3 during hepatitis C virus infection*. J Virol, 2014. **88**(3): p. 1582-90.
32. Spurrell, J.C., et al., *Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(1): p. L85-95.
33. Takahashi, K., et al., *Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4520-4.
34. Lawrence, T., *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a001651.
35. Palm, N.W. and R. Medzhitov, *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 221-33.
36. Besch, R., et al., *Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(8): p. 2399-411.
37. Matsushima-Miyagi, T., et al., *TRAIL and Noxa are selectively upregulated in prostate cancer cells downstream of the RIG-I/MAVS signaling pathway by nonreplicating Sendai virus particles*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(22): p. 6271-83.
38. Elion, D.L., et al., *Therapeutically Active RIG-I Agonist Induces Immunogenic Tumor Cell Killing in Breast Cancers*. Cancer Res, 2018. **78**(21): p. 6183-6195.
39. Vande Walle, L. and M. Lamkanfi, *Pyroptosis*. Curr Biol, 2016. **26**(13): p. R568-r572.

40. Duewell, P., et al., *RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells*. Cell Death Differ, 2014. **21**(12): p. 1825-37.
41. Furr, S.R. and I. Marriott, *Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 201.
42. Zhang, N.N., et al., *RIG-I plays a critical role in negatively regulating granulocytic proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10553-8.
43. Li, X.Y., et al., *RIG-I modulates Src-mediated AKT activation to restrain leukemic stemness*. Mol Cell, 2014. **53**(3): p. 407-19.
44. Jiang, L.J., et al., *RA-inducible gene-1 induction augments STAT1 activation to inhibit leukemia cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(5): p. 1897-902.
45. Hou, J., et al., *Hepatic RIG-I predicts survival and interferon-alpha therapeutic response in hepatocellular carcinoma*. Cancer Cell, 2014. **25**(1): p. 49-63.
46. Li, D., et al., *5'-Triphosphate siRNA targeting MDR1 reverses multi-drug resistance and activates RIG-I-induced immune-stimulatory and apoptotic effects against human myeloid leukaemia cells*. Leuk Res, 2017. **58**: p. 23-30.
47. Bhoopathi, P., et al., *Pancreatic cancer-specific cell death induced in vivo by cytoplasmic-delivered polyinosine-polycytidylic acid*. Cancer Res, 2014. **74**(21): p. 6224-35.
48. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
49. Hammond, S.M., et al., *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-6.
50. Haasnoot, J., E.M. Westerhout, and B. Berkhout, *RNA interference against viruses: strike and counterstrike*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(12): p. 1435-43.
51. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
52. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
53. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
54. Elbashir, S.M., et al., *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate*. Embo j, 2001. **20**(23): p. 6877-88.
55. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
56. Tomari, Y. and P.D. Zamore, *Perspective: machines for RNAi*. Genes Dev, 2005. **19**(5): p. 517-29.
57. Matranga, C., et al., *Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes*. Cell, 2005. **123**(4): p. 607-20.
58. Schlee, M., V. Hornung, and G. Hartmann, *siRNA and isRNA: two edges of one sword*. Mol Ther, 2006. **14**(4): p. 463-70.
59. Kanasty, R., et al., *Delivery materials for siRNA therapeutics*. Nat Mater, 2013. **12**(11): p. 967-77.
60. Rubin, B.P., M.C. Heinrich, and C.L. Corless, *Gastrointestinal stromal tumour*. Lancet, 2007. **369**(9574): p. 1731-41.
61. Brooks, M.D., M.L. Burness, and M.S. Wicha, *Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(3): p. 260-71.
62. Curiel, T.J., *Tregs and rethinking cancer immunotherapy*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1167-74.

63. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 54-61.
64. Uno, T., et al., *Eradication of established tumors in mice by a combination antibody-based therapy*. Nat Med, 2006. **12**(6): p. 693-8.
65. Poeck, H., et al., *5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and RIG-I activation against melanoma*. Nat Med, 2008. **14**(11): p. 1256-63.
66. Muik, A., et al., *Re-engineering vesicular stomatitis virus to abrogate neurotoxicity, circumvent humoral immunity, and enhance oncolytic potency*. Cancer Res, 2014. **74**(13): p. 3567-78.
67. Ellermeier, J., et al., *Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(6): p. 1709-20.
68. Wang, K., et al., *5'-triphosphate-siRNA against survivin gene induces interferon production and inhibits proliferation of lung cancer cells in vitro*. J Immunother, 2013. **36**(5): p. 294-304.
69. Meng, G., et al., *Multifunctional antitumor molecule 5'-triphosphate siRNA combining glutaminase silencing and RIG-I activation*. Int J Cancer, 2014. **134**(8): p. 1958-71.
70. Matheis, F. and R. Besch, *Bifunctional siRNAs for tumor therapy*. Methods Mol Biol, 2014. **1169**: p. 181-92.
71. Fialkow, P.J., J.W. Janssen, and C.R. Bartram, *Clonal remissions in acute nonlymphocytic leukemia: evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy*. Blood, 1991. **77**(7): p. 1415-7.
72. Metzeler, K.H., et al., *Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia*. Blood, 2016. **128**(5): p. 686-98.
73. Dohner, H. and V.I. Gaidzik, *Impact of genetic features on treatment decisions in AML*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 36-42.
74. Marcucci, G., T. Haferlach, and H. Dohner, *Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications*. J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 475-86.
75. Schlenk, R.F., et al., *Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2008. **358**(18): p. 1909-18.
76. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
77. Dombret, H. and C. Gardin, *An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia*. Blood, 2016. **127**(1): p. 53-61.
78. Juliusson, G., et al., *Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed*. Blood, 2012. **119**(17): p. 3890-9.
79. Ishikawa, F., et al., *Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1315-21.
80. Mikkola, H.K., C.G. Radu, and O.N. Witte, *Targeting leukemia stem cells*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(3): p. 237-8.
81. Pemmaraju, N., et al., *Investigational FMS-like tyrosine kinase 3 inhibitors in treatment of acute myeloid leukemia*. Expert Opin Investig Drugs, 2014. **23**(7): p. 943-54.
82. Issa, J.P., et al., *Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(9): p. 1099-110.

83. Dombret, H., et al., *A Phase 1 Study of the BET-Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Advanced Acute Leukemia*. Blood, 2014. **124**(21): p. 117-117.
84. Stein, E.M., et al., *AG-221, an Oral, Selective, First-in-Class, Potent Inhibitor of the IDH2 Mutant Metabolic Enzyme, Induces Durable Remissions in a Phase I Study in Patients with IDH2 Mutation Positive Advanced Hematologic Malignancies*. Blood, 2014. **124**(21): p. 115-115.
85. Medeiros, B.C., et al., *Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies*. Leukemia, 2017. **31**(2): p. 272-281.
86. Lichtenegger, F.S., et al., *Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia*. J Hematol Oncol, 2017. **10**(1): p. 142.
87. Kung Sutherland, M.S., et al., *SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML*. Blood, 2013. **122**(8): p. 1455-63.
88. Bixby, D.L., et al., *Vadastuximab Talirine Monotherapy in Older Patients with Treatment Naive CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia (AML)*. Blood, 2016. **128**(22): p. 590-590.
89. Fathi, A.T., et al., *Vadastuximab Talirine Plus Hypomethylating Agents: A Well-Tolerated Regimen with High Remission Rate in Frontline Older Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML)*. Blood, 2016. **128**(22): p. 591-591.
90. Testa, U., E. Pelosi, and A. Frankel, *CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies*. Biomark Res, 2014. **2**(1): p. 4.
91. Aigner, M., et al., *T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct*. Leukemia, 2013. **27**(5): p. 1107-15.
92. Krupka, C., et al., *CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330*. Blood, 2014. **123**(3): p. 356-65.
93. Dietz, H., S.M. Douglas, and W.M. Shih, *Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes*. Science, 2009. **325**(5941): p. 725-30.
94. Douglas, S.M., et al., *Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 414-8.
95. Liedl, T., et al., *Self-assembly of three-dimensional prestressed tensegrity structures from DNA*. Nat Nanotechnol, 2010. **5**(7): p. 520-4.
96. Rothemund, P.W., *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 297-302.
97. Rothemund, P.W., N. Papadakis, and E. Winfree, *Algorithmic self-assembly of DNA Sierpinski triangles*. PLoS Biol, 2004. **2**(12): p. e424.
98. Seeman, N.C., *Nucleic acid junctions and lattices*. J Theor Biol, 1982. **99**(2): p. 237-47.
99. Voigt, N.V., et al., *Single-molecule chemical reactions on DNA origami*. Nat Nanotechnol, 2010. **5**(3): p. 200-3.
100. Tigges, T., et al., *3D DNA Origami Cuboids as Monodisperse Patchy Nanoparticles for Switchable Hierarchical Self-Assembly*. Nano Lett, 2016. **16**(12): p. 7870-7874.
101. Li, J., et al., *Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides*. ACS Nano, 2011. **5**(11): p. 8783-9.
102. Zhao, Y.X., et al., *DNA origami delivery system for cancer therapy with tunable release properties*. ACS Nano, 2012. **6**(10): p. 8684-91.
103. Jiang, Q., et al., *DNA origami as a carrier for circumvention of drug resistance*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(32): p. 13396-403.

104. Zhang, Q., et al., *DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy*. ACS Nano, 2014. **8**(7): p. 6633-43.
105. Douglas, S.M., I. Bachelet, and G.M. Church, *A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads*. Science, 2012. **335**(6070): p. 831-4.
106. Sellner, S., et al., *DNA nanotubes as intracellular delivery vehicles in vivo*. Biomaterials, 2015. **53**: p. 453-63.
107. Schuller, V.J., et al., *Cellular immunostimulation by CpG-sequence-coated DNA origami structures*. ACS Nano, 2011. **5**(12): p. 9696-702.
108. Mohri, K., et al., *Self-assembling DNA dendrimer for effective delivery of immunostimulatory CpG DNA to immune cells*. Biomacromolecules, 2015. **16**(4): p. 1095-101.
109. Lee, H., et al., *Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery*. Nat Nanotechnol, 2012. **7**(6): p. 389-93.
110. Goodman, R.P., et al., *Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication*. Science, 2005. **310**(5754): p. 1661-5.
111. Shih, W.M., J.D. Quispe, and G.F. Joyce, *A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron*. Nature, 2004. **427**(6975): p. 618-21.
112. Wei, B., M. Dai, and P. Yin, *Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles*. Nature, 2012. **485**(7400): p. 623-6.
113. Yin, P., et al., *Programming DNA tube circumferences*. Science, 2008. **321**(5890): p. 824-6.
114. Rothmund, P.W., et al., *Design and characterization of programmable DNA nanotubes*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(50): p. 16344-52.
115. Andersen, E.S., et al., *Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid*. Nature, 2009. **459**(7243): p. 73-6.
116. Farkhani, S.M., et al., *Cell penetrating peptides: efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules*. Peptides, 2014. **57**: p. 78-94.
117. Chang, M., C.S. Yang, and D.M. Huang, *Aptamer-conjugated DNA icosahedral nanoparticles as a carrier of doxorubicin for cancer therapy*. ACS Nano, 2011. **5**(8): p. 6156-63.
118. Zhu, G., et al., *Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanotrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(20): p. 7998-8003.
119. Bahrami, B., et al., *Folate-conjugated nanoparticles as a potent therapeutic approach in targeted cancer therapy*. Tumour Biol, 2015. **36**(8): p. 5727-42.
120. Parker, N., et al., *Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay*. Anal Biochem, 2005. **338**(2): p. 284-93.
121. al., A.S.e., *5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I*. PNAS, 2009.
122. Glas, M., et al., *Targeting the cytosolic innate immune receptors RIG-I and MDA5 effectively counteracts cancer cell heterogeneity in glioblastoma*. Stem Cells, 2013. **31**(6): p. 1064-74.
123. Yuan, B., et al., *siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W130-4.
124. Kocabey, S., et al., *Cellular Uptake of Tile-Assembled DNA Nanotubes*. Nanomaterials, 2015. **5**(1): p. 47.
125. Kato, H., et al., *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1601-10.

126. Dufour, J.H., et al., *IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3195-204.
127. Zuber, J., et al., *RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia*. Nature, 2011. **478**(7370): p. 524-8.
128. Sahni, J.M., et al., *Mitotic Vulnerability in Triple-Negative Breast Cancer Associated with LIN9 Is Targetable with BET Inhibitors*. Cancer Res, 2017. **77**(19): p. 5395-5408.
129. Kiyoi, H., et al., *Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia*. Blood, 1999. **93**(9): p. 3074-80.
130. Rombouts, W.J., et al., *Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene*. Leukemia, 2000. **14**(4): p. 675-83.
131. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2434-9.
132. Quentmeier, H., et al., *FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines*. Leukemia, 2003. **17**(1): p. 120-4.
133. Sanderson, R.N., et al., *Population-based demographic study of karyotypes in 1709 patients with adult acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2006. **20**(3): p. 444-50.
134. Valk, P.J., et al., *Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2004. **350**(16): p. 1617-28.
135. Arber, D.A., et al., *Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival*. Am J Clin Pathol, 2003. **119**(5): p. 672-80.
136. Licht, J.D., *AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5660-79.
137. Barr, F.A., H.H. Sillje, and E.A. Nigg, *Polo-like kinases and the orchestration of cell division*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 429-40.
138. Renner, A.G., et al., *Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells*. Blood, 2009. **114**(3): p. 659-62.
139. Munch, C., et al., *Therapeutic polo-like kinase 1 inhibition results in mitotic arrest and subsequent cell death of blasts in the bone marrow of AML patients and has similar effects in non-neoplastic cell lines*. Leuk Res, 2015. **39**(4): p. 462-70.
140. Call, K.M., et al., *Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus*. Cell, 1990. **60**(3): p. 509-20.
141. Miyagi, T., et al., *Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells*. Leukemia, 1993. **7**(7): p. 970-7.
142. Miwa, H., M. Beran, and G.F. Saunders, *Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias*. Leukemia, 1992. **6**(5): p. 405-9.
143. Menssen, H.D., et al., *Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias*. Leukemia, 1995. **9**(6): p. 1060-7.
144. King-Underwood, L., J. Renshaw, and K. Pritchard-Jones, *Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2171-9.
145. Hou, H.A., et al., *WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system*. Blood, 2010. **115**(25): p. 5222-31.

146. Bergmann, L., et al., *High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome*. Blood, 1997. **90**(3): p. 1217-25.
147. Barragan, E., et al., *Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2004. **89**(8): p. 926-33.
148. Algar, E.M., et al., *A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines*. Oncogene, 1996. **12**(5): p. 1005-14.
149. Ito, K., et al., *Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway*. Oncogene, 2006. **25**(30): p. 4217-29.
150. Yamagami, T., et al., *Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis*. Blood, 1996. **87**(7): p. 2878-84.
151. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
152. Rinkenberger, J.L., et al., *Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality*. Genes Dev, 2000. **14**(1): p. 23-7.
153. Opferman, J.T., et al., *Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1101-4.
154. Opferman, J.T., et al., *Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 671-6.
155. Dzhagalov, I., A. St John, and Y.W. He, *The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1620-6.
156. Arbour, N., et al., *Mcl-1 is a key regulator of apoptosis during CNS development and after DNA damage*. J Neurosci, 2008. **28**(24): p. 6068-78.
157. Beroukhi, R., et al., *The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers*. Nature, 2010. **463**(7283): p. 899-905.
158. Glaser, S.P., et al., *Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia*. Genes Dev, 2012. **26**(2): p. 120-5.
159. Lin, K.H., et al., *Targeting MCL-1/BCL-XL Forestalls the Acquisition of Resistance to ABT-199 in Acute Myeloid Leukemia*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 27696.
160. Hermanson, D.L., et al., *Overexpression of Mcl-1 confers multidrug resistance, whereas topoisomerase IIbeta downregulation introduces mitoxantrone-specific drug resistance in acute myeloid leukemia*. Mol Pharmacol, 2013. **84**(2): p. 236-43.
161. E, O.R., et al., *Repression of Mcl-1 expression by the CDC7/CDK9 inhibitor PHA-767491 overcomes bone marrow stroma-mediated drug resistance in AML*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15752.
162. Deschamps, J., et al., *Initiation, establishment and maintenance of Hox gene expression patterns in the mouse*. Int J Dev Biol, 1999. **43**(7): p. 635-50.
163. Abramovich, C. and R.K. Humphries, *Hox regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells*. Curr Opin Hematol, 2005. **12**(3): p. 210-6.
164. Scholl, C., et al., *The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 1037-48.
165. Borer, R.A., et al., *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm*. Cell, 1989. **56**(3): p. 379-90.

166. Savkur, R.S. and M.O. Olson, *Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(19): p. 4508-15.
167. Grisendi, S., et al., *Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis*. Nature, 2005. **437**(7055): p. 147-53.
168. Ahn, J.Y., et al., *Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD*. Mol Cell, 2005. **18**(4): p. 435-45.
169. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. **352**(3): p. 254-66.
170. Vassiliou, G.S., et al., *Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice*. Nat Genet, 2011. **43**(5): p. 470-5.
171. Lee, H., *Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery*. Nature Nanotechnology, 2012.
172. Kubler, K., et al., *Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells*. Eur J Immunol, 2011. **41**(10): p. 3028-39.
173. Curtsinger, J.M., et al., *Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4465-9.
174. Kolumam, G.A., et al., *Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection*. J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 637-50.
175. Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell, *Type I interferons keep activated T cells alive*. J Exp Med, 1999. **189**(3): p. 521-30.
176. Simmons, D.P., et al., *Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing*. J Immunol, 2012. **188**(7): p. 3116-26.
177. Le Bon, A., et al., *Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4682-9.
178. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
179. Jegu, G., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6*. Immunity, 2003. **19**(2): p. 225-34.
180. Le Bon, A., et al., *Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo*. Immunity, 2001. **14**(4): p. 461-70.
181. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
182. Zitvogel, L., et al., *Type I interferons in anticancer immunity*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(7): p. 405-14.
183. Burnette, B.C., et al., *The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity*. Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2488-96.
184. Deng, L., et al., *STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 843-52.
185. Moschella, F., et al., *Cyclophosphamide induces a type I interferon-associated sterile inflammatory response signature in cancer patients' blood cells: implications for cancer chemoimmunotherapy*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(15): p. 4249-61.

186. Moschos, S., S. Varanasi, and J.M. Kirkwood, *Interferons in the treatment of solid tumors*. Cancer Treat Res, 2005. **126**: p. 207-41.
187. Sistigu, A., et al., *Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1301-9.
188. Yang, X., et al., *Targeting the tumor microenvironment with interferon-beta bridges innate and adaptive immune responses*. Cancer Cell, 2014. **25**(1): p. 37-48.
189. Anguille, S., et al., *Interferon-alpha in acute myeloid leukemia: an old drug revisited*. Leukemia, 2011. **25**(5): p. 739-48.
190. Colamonici, O.R., et al., *Correlation between interferon (IFN) alpha resistance and deletion of the IFN alpha/beta genes in acute leukemia cell lines suggests selection against the IFN system*. Blood, 1992. **80**(3): p. 744-9.
191. Smits, E.L., S. Anguille, and Z.N. Berneman, *Interferon alpha may be back on track to treat acute myeloid leukemia*. Oncoimmunology, 2013. **2**(4): p. e23619.
192. Benjamin, R., et al., *Continuous delivery of human type I interferons (alpha/beta) has significant activity against acute myeloid leukemia cells in vitro and in a xenograft model*. Blood, 2007. **109**(3): p. 1244-7.
193. Rintahaka, J., et al., *Cytosolic antiviral RNA recognition pathway activates caspases 1 and 3*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1749-57.
194. Yu, X., et al., *Activation of the MDA-5-IPS-1 Viral Sensing Pathway Induces Cancer Cell Death and Type I IFN-Dependent Antitumor Immunity*. Cancer Res, 2016. **76**(8): p. 2166-76.
195. Balachandran, S., et al., *Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1513-23.
196. Gil, J., J. Alami, and M. Esteban, *Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4653-63.
197. Chawla-Sarkar, M., et al., *Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(3): p. 237-49.
198. Yu, C.Y., et al., *The interferon stimulator mitochondrial antiviral signaling protein facilitates cell death by disrupting the mitochondrial membrane potential and by activating caspases*. J Virol, 2010. **84**(5): p. 2421-31.
199. Guan, K., et al., *MAVS regulates apoptotic cell death by decreasing K48-linked ubiquitination of voltage-dependent anion channel 1*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(16): p. 3137-49.
200. El Maadidi, S., et al., *A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis*. J Immunol, 2014. **192**(3): p. 1171-83.
201. Eitz Ferrer, P., et al., *Induction of Noxa-mediated apoptosis by modified vaccinia virus Ankara depends on viral recognition by cytosolic helicases, leading to IRF-3/IFN-beta-dependent induction of pro-apoptotic Noxa*. PLoS Pathog, 2011. **7**(6): p. e1002083.
202. Lei, Y., et al., *MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5466.
203. Chattopadhyay, S., et al., *Ubiquitination of the Transcription Factor IRF-3 Activates RIPA, the Apoptotic Pathway that Protects Mice from Viral Pathogenesis*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 1151-61.
204. Chattopadhyay, S., et al., *Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax*. EMBO J, 2010. **29**(10): p. 1762-73.

205. Kirshner, J.R., et al., *Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 9320-4.
206. Knowlton, J.J., T.S. Dermody, and G.H. Holm, *Apoptosis induced by mammalian reovirus is beta interferon (IFN) independent and enhanced by IFN regulatory factor 3- and NF-kappaB-dependent expression of Noxa*. J Virol, 2012. **86**(3): p. 1650-60.
207. Kubler, K., et al., *Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-1 induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(13): p. 5293-304.
208. Schnurr, M. and P. Duewell, *Breaking tumor-induced immunosuppression with 5'-triphosphate siRNA silencing TGFbeta and activating RIG-I*. Oncoimmunology, 2013. **2**(5): p. e24170.
209. Hu, J., et al., *Dose dependent activation of retinoic acid-inducible gene-1 promotes both proliferation and apoptosis signals in human head and neck squamous cell carcinoma*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58273.
210. Kaneda, Y., *The RIG-I/MAVS signaling pathway in cancer cell-selective apoptosis*. Oncoimmunology, 2013. **2**(4): p. e23566.
211. Qu, J., et al., *Poly(I:C) exhibits an anti-cancer effect in human gastric adenocarcinoma cells which is dependent on RLRs*. Int Immunopharmacol, 2013. **17**(3): p. 814-20.
212. Boelens, M.C., et al., *Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways*. Cell, 2014. **159**(3): p. 499-513.
213. Hammond, S.M., A.A. Caudy, and G.J. Hannon, *Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(2): p. 110-9.
214. Wang, J., et al., *Imaging-guided delivery of RNAi for anticancer treatment*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **104**: p. 44-60.
215. Landry, B., et al., *Progress in RNAi-mediated Molecular Therapy of Acute and Chronic Myeloid Leukemia*. Mol Ther Nucleic Acids, 2015. **4**: p. e240.
216. Gish, R.G., et al., *RNA interference and its potential applications to chronic HBV treatment: results of a Phase I safety and tolerability study*. Antivir Ther, 2011. **16**(4): p. 547-54.
217. Swamy, M.N., H. Wu, and P. Shankar, *Recent advances in RNAi-based strategies for therapy and prevention of HIV-1/AIDS*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **103**: p. 174-86.
218. Kaiser, P.K., et al., *RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027*. Am J Ophthalmol, 2010. **150**(1): p. 33-39 e2.
219. Coelho, T., et al., *Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis*. N Engl J Med, 2013. **369**(9): p. 819-29.
220. Adams, D., et al., *Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis*. N Engl J Med, 2018. **379**(1): p. 11-21.
221. Mardis, E.R., et al., *Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome*. N Engl J Med, 2009. **361**(11): p. 1058-66.
222. SY Wu, C.C., *The Double Bromodomain-containing Chromatin Adaptor Brd4 and Transcriptional Regulation*. J. Biol. Chem., 2007.
223. Guo, J., et al., *Antibody-Targeted Cyclodextrin-Based Nanoparticles for siRNA Delivery in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: Physicochemical Characteristics, in Vitro Mechanistic Studies, and ex Vivo Patient Derived Therapeutic Efficacy*. Mol Pharm, 2017. **14**(3): p. 940-952.
224. Berthon, C., et al., *Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase 1 study*. Lancet Haematol, 2016. **3**(4): p. e186-95.

225. Fong, C.Y., et al., *BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells*. Nature, 2015. **525**(7570): p. 538-42.
226. Rathert, P., et al., *Transcriptional plasticity promotes primary and acquired resistance to BET inhibition*. Nature, 2015. **525**(7570): p. 543-547.
227. Fiskus, W., et al., *BET protein antagonist JQ1 is synergistically lethal with FLT3 tyrosine kinase inhibitor (TKI) and overcomes resistance to FLT3-TKI in AML cells expressing FLT-ITD*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(10): p. 2315-27.
228. Gilan, O., et al., *Functional interdependence of BRD4 and DOT1L in MLL leukemia*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(7): p. 673-81.
229. Roe, J.S. and C.R. Vakoc, *The Essential Transcriptional Function of BRD4 in Acute Myeloid Leukemia*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2016. **81**: p. 61-66.
230. Yokota, S., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines*. Leukemia, 1997. **11**(10): p. 1605-9.
231. Hassanein, M., et al., *FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2016.
232. Kancha, R.K., et al., *Sensitivity toward sorafenib and sunitinib varies between different activating and drug-resistant FLT3-ITD mutations*. Exp Hematol, 2007. **35**(10): p. 1522-6.
233. Cools, J., et al., *Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia*. Cancer Res, 2004. **64**(18): p. 6385-9.
234. Heidel, F., et al., *Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain*. Blood, 2006. **107**(1): p. 293-300.
235. Adam, M., et al., *Targeting PIM kinases impairs survival of hematopoietic cells transformed by kinase inhibitor-sensitive and kinase inhibitor-resistant forms of Fms-like tyrosine kinase 3 and BCR/ABL*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3828-35.
236. Pagliarini, R., W. Shao, and W.R. Sellers, *Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure*. EMBO Rep, 2015. **16**(3): p. 280-96.
237. Mohi, M.G., et al., *Combination of rapamycin and protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors for the treatment of leukemias caused by oncogenic PTKs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3130-5.
238. Nishioka, C., et al., *Blockade of MEK/ERK signaling enhances sunitinib-induced growth inhibition and apoptosis of leukemia cells possessing activating mutations of the FLT3 gene*. Leuk Res, 2008. **32**(6): p. 865-72.
239. He, W., et al., *Discovery of siRNA lipid nanoparticles to transfect suspension leukemia cells and provide in vivo delivery capability*. Mol Ther, 2014. **22**(2): p. 359-70.
240. Walters, D.K., et al., *RNAi-induced down-regulation of FLT3 expression in AML cell lines increases sensitivity to MLN518*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2952-4.
241. Wang, C.M., et al., *Effect of small interfering RNA targeting wild-type FLT3 in acute myeloid leukaemia cells in vitro and in vivo*. J Int Med Res, 2011. **39**(5): p. 1661-74.
242. Wiemels, J.L., et al., *In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3801-5.

243. Yuan, Y., et al., *AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10398-403.
244. Forster, V.J., et al., *The leukemia-associated RUNX1/ETO oncoprotein confers a mutator phenotype*. Leukemia, 2016. **30**(1): p. 250-3.
245. Ptasinska, A., et al., *Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding*. Leukemia, 2012. **26**(8): p. 1829-41.
246. Brandwein, J.M., *Targeting polo-like kinase 1 in acute myeloid leukemia*. Ther Adv Hematol, 2015. **6**(2): p. 80-7.
247. Vitour, D., et al., *Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 21797-809.
248. Abbas, S., et al., *Mutant Wilms' tumor 1 (WT1) mRNA with premature termination codons in acute myeloid leukemia (AML) is sensitive to nonsense-mediated RNA decay (NMD)*. Leukemia, 2010. **24**(3): p. 660-3.
249. Bansal, H., et al., *Heat shock protein 90 regulates the expression of Wilms tumor 1 protein in myeloid leukemias*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4591-9.
250. Rampal, R. and M.E. Figueroa, *Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2016. **101**(6): p. 672-9.
251. Bose, P. and S. Grant, *Mcl-1 as a Therapeutic Target in Acute Myelogenous Leukemia (AML)*. Leuk Res Rep, 2013. **2**(1): p. 12-14.
252. Karami, H., et al., *Therapeutic Effects of Myeloid Cell Leukemia-1 siRNA on Human Acute Myeloid Leukemia Cells*. Adv Pharm Bull, 2014. **4**(3): p. 243-8.
253. Kasper, S., et al., *Targeting MCL-1 sensitizes FLT3-ITD-positive leukemias to cytotoxic therapies*. Blood Cancer J, 2012. **2**(3): p. e60.
254. Vu, T., et al., *Cdx2 Cooperates with Flt3-ITD to Induce Acute Myeloid Leukaemia in Mice*. Blood, 2015. **126**(23): p. 557-557.
255. Schnittger, S., et al., *Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3733-9.
256. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features*. Blood, 2007. **109**(3): p. 874-85.
257. Balusu, R., et al., *Targeting levels or oligomerization of nucleophosmin 1 induces differentiation and loss of survival of human AML cells with mutant NPM1*. Blood, 2011. **118**(11): p. 3096-106.
258. Kim, D.H., et al., *Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 321-5.
259. Seo, G.J., et al., *Reciprocal inhibition between intracellular antiviral signaling and the RNAi machinery in mammalian cells*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(4): p. 435-45.
260. Alexis, F., et al., *Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Mol Pharm, 2008. **5**(4): p. 505-15.
261. Whitehead, K.A., R. Langer, and D.G. Anderson, *Knocking down barriers: advances in siRNA delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(2): p. 129-38.
262. Akinc, A., et al., *A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(5): p. 561-9.
263. Li, W. and F.C. Szoka, Jr., *Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery*. Pharm Res, 2007. **24**(3): p. 438-49.
264. Pack, D.W., et al., *Design and development of polymers for gene delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(7): p. 581-93.

265. Dassie, J.P., et al., *Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(9): p. 839-49.
266. Sokolova, V. and M. Eppele, *Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(8): p. 1382-95.
267. Xia, W. and P.S. Low, *Folate-targeted therapies for cancer*. J Med Chem, 2010. **53**(19): p. 6811-24.
268. Hong, C.A., et al., *Self-assembled DNA nanostructures prepared by rolling circle amplification for the delivery of siRNA conjugates*. Chem Commun (Camb), 2014. **50**(86): p. 13049-51.
269. Ko, S., et al., *DNA nanotubes as combinatorial vehicles for cellular delivery*. Biomacromolecules, 2008. **9**(11): p. 3039-43.
270. Ma, D., *Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery*. Nanoscale, 2014. **6**(12): p. 6415-25.
271. Haussecker, D., *Current issues of RNAi therapeutics delivery and development*. J Control Release, 2014. **195**: p. 49-54.
272. Bale, S.S., et al., *Nanoparticle-mediated cytoplasmic delivery of proteins to target cellular machinery*. ACS Nano, 2010. **4**(3): p. 1493-500.
273. Hahn, J., et al., *Addressing the instability of DNA nanostructures in tissue culture*. ACS Nano, 2014. **8**(9): p. 8765-75.
274. Li, J., et al., *Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis*. Curr Biol, 2005. **15**(16): p. 1501-7.
275. Yu, B., et al., *Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis*. Science, 2005. **307**(5711): p. 932-5.
276. Loke, S.L., et al., *Characterization of oligonucleotide transport into living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3474-8.
277. Yakubov, L.A., et al., *Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6454-8.
278. de Diesbach, P., et al., *Identification, purification and partial characterisation of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(4): p. 868-74.
279. Laktionov, P.P., et al., *Characterisation of membrane oligonucleotide-binding proteins and oligonucleotide uptake in keratinocytes*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(11): p. 2315-24.

7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

2'-Ome	2'-O-Methylierung
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
Ago2	Argonautenprotein 2
AKT	Proteinkinase B, PKB
AML	Akute Myeloische Leukämie
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
APL	Akuten Promyelozytenleukämie
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	<i>all-trans-retinoic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-x _L	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BET	<i>bromodomain and extraterminal domain</i>
BiTE	<i>Bi-specific T-cell engagers</i>
bp	Basenpaar
BRD4	<i>bromodomain-containing 4</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
Cardif	<i>CARD-adaptor inducing IFN-β</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDX2	<i>caudal type homeobox 2</i>
CLR	C-Typ Lecitin-Rezeptor
CTB	<i>Cell Titer Blue</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methytransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate

7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

DOT1L	<i>Disruptor of telomeric silencing 1-like</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ETO	<i>eight-twenty-one</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FCS	<i>fetal calve serum</i>
FLT3	<i>fms-like tyrosine kinase 3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HVJ-E	<i>Hemagglutinating virus of Japan Envelope</i>
ICSBP	<i>interferon consensus sequence binding protein</i>
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IFN- α	Alpha-Interferon
IKK ϵ	I κ B kinase- ϵ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IP-10	<i>interferon gamma-induced protein 10</i>
IPS-1	IFN- β -promoter stimulator 1
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
ISG	<i>interferon-stimulierten Genen</i>
ITD	Interne Tandem Duplikation
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
IVT-RNA	<i>in vitro</i> transkribierten RNA
LPG2	<i>laboratory of genetics and physiology-2</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LSC	<i>leukemic stem cell</i>

7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MCL1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation antigen 5</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MFI	<i>median fluorescence intensity</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NLR	NOD-like Rezeptor
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NPM1	<i>nucleophosmin 1</i>
nt	Nukleotid
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PI	Propiumiodid
PKB	Proteinkinase B
PLK1	<i>Polo-like kinase 1</i>
poly(I:C)	Polyinosin-Polycytidin-Säure
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RD	<i>repressor domain</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLR	RIG-I-like Rezeptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RUNX1	<i>runt-related transcription factor 1</i>

7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

scFv	<i>single chain variable fragments</i>
SFI	<i>specific fluorescence intensity</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
SST	<i>single-strand tile</i>
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
Tab.	Tabelle
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	<i>tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Typ-I-IFN	Typ-I-Interferonen
UTR	<i>untranslated region</i>
VISA	<i>virus-induced signaling adapter</i>
WI	<i>Whitehead Institute</i>
WT1	Wilms-Tumor-Proteins 1

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Dissertation zu erstellen.

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Endres möchte ich mich für das wissenschaftlich interessante sowie persönlich bereichernde Umfeld seiner *Abteilung für Klinische Pharmakologie* bedanken.

Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Simon Rothenfußer für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Labor anzufertigen. Besonders dankbar bin ich für die persönliche Förderung, die wissenschaftliche Unterstützung, die kompetente und intensive Betreuung sowie das inspirierende Arbeitsumfeld.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Felix Lichtenegger für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten sowie die kompetente und engagierte Betreuung.

Herzlichen Dank auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe, die jederzeit gerne für technische Fragen und wissenschaftliche Diskussionen zur Verfügung standen. Besonderer Dank hier an meine Mitdoktoranden Marcus Zeitlhöfler, Sofía Antón und Maximilian Gradel, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Kollaborationspartnern Prof. Dr. Liedl und Samet Kocabey für die gute und konstruktive Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich dem *Förderprogramm für Forschung und Lehre der LMU München* zur Aufnahme in den Promotionsstudiengang.

Schließlich bedanke ich mich von Herzen für die fortdauernde konstruktive Unterstützung, Motivation und Inspiration durch meine Familie, bei meinen Eltern Edgar und Ingrid Meinl sowie meinem Bruder Lorenz Meinl für den uneingeschränkten Rückhalt und die Liebe, die sie mir gegeben haben. Und ich danke auch von Herzen Marvin Lausmann für die uneingeschränkte Unterstützung und das Verständnis, die mich immer wieder aufs Neue ermutigt und mir Kraft gegeben haben.

9 Veröffentlichungen

9.1 Originalarbeiten

Kocabey S, **Meinl H**, MacPherson IS, Cassinelli V, Manetto A, Rothenfuß S, Liedl T and Lichtenegger FS.

Cellular Uptake of Tile-Assembled DNA Nanotubes.

Nanomaterials, 2015, 5(1), 47-60.

Matthias J, Maul J, Noster R, **Meinl H**, Chao YY, Gerstenberg H, Jeschke F, Gilles G, Welle A, Walter J, Nordstroem K, Eberhardt K, Renisch D, Donakonda S, Knolle P, Soll D, Grabbe S, Garzorz-Stark N, Eyerich K, Biedermann T, Baumjohann D, Zielinski CE.

Sodium chloride is an ionic checkpoint for human Th2 cells and shapes the atopic skin microenvironment.

Science Translational Medicine, 2019 Feb 20;11(480).

Ruzicka M*, Koenig LM*, Formisano S, Boehmer D, Vick B, Heuer EM, **Meinl H**, Kocheise L, Zeitlhöfler M, Ahlfeld J, Endres S, Subklewe M, Duewell P, Schnurr M, Jeremias I, Lichtenegger FS* and Rothenfusser S*.

* M.R. and L.M.K as well as F.S.L. and S.R. contributed equally to this work.

RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade.

Leukemia, 2019, *accepted*.

9.2 Abstracts und Poster

Meinl H, Zeitlhöfler M, Kocabey S, Liedl T, Hiddemann W, Subklewe M, Endres S, Rothenfuß S and Lichtenegger FS.

Bifunctional Immunoactive siRNAs as an Approach to Personalized AML Therapy.

American Society of Hematology (ASH) 55th Annual Meeting, New Orleans, 2013, Blood 2013 122:5036.

Meinl H, Lichtenegger FS, Zeitlhöfler M, Kocabey S, Liedl T, Endres S, Subklewe M and Rothenfuß S.

Bifunctional siRNAs as an Approach to Personalized AML Therapy.

Wissenschaftliches Symposium der Med. Klinik III, Herrsching, 2013.

Meinl H, Zielinski CE.

Distinct regulation of IL-13 and IL-4 producing T helper cells.

1st German Mass Cytometry User Forum, Berlin, 2018.

Meinl H, Soll D, Matthias J, Zielinski CE.

Regulation of T cell antitumor immunity by tonic signals from the tumor microenvironment.

SFB 1054 Symposium, Regulation of Lymphocyte Responses by Tissue Microenvironment, Martinsried, 2018.

9.3 Vorträge

Bifunctional Immunoactive siRNAs as an Approach to Personalized AML Therapy.

Annual Retreat des Graduiertenkollegs 1202 der DFG, Ohlstadt, 2013.




Regulation of T cell antitumor immunity by tonic signals from the tumor microenvironment.

TranslaTUM Retreat, Munich, 2018.

T cell tissue residency: thinking outside the blood.

SFB 1054, Annual Meeting, Bad Kohlgrub, 2018.

10 Affidavit

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät 	
Eidesstattliche Versicherung			

Lausmann, Hanna

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

***In vitro* Evaluation RIG-I-aktivierender, bifunktioneller siRNAs zur Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 05.11.2020

Ort, Datum

Hanna Lausmann

Unterschrift Doktorandin